Über die Verarbeitung der Oxalsäure durch Bacillus extorquens n. sp.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

VORGELEGT VON

KASIMIR BASSALIK

AUS BRZEZIE (POSEN)

Mit 2 Textfiguren

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1913

Über die Verarbeitung der Oxalsäure durch Bacillus extorquens n. sp.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

VORGELEGT VON

KASIMIR BASSALIK

AUS BRZEZIE (POSEN)

Mit 2 Textfiguren

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1913

Genehmigt von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren DDr. G. Senn und H. Rupe.

Basel, den 11. Juli 1913.

E. Hoffmann-Krayer
Dekan.

Sonderabdruck aus den
„Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik“, Bd. LIII.

I. Einleitung.

Durch den jährlichen Laubfall, durch Borkenabschuppung der Holzgewächse, durch das herbstliche Absterben der einjährigen und der perennierenden Pflanzen u. dergl. gelangen beträchtliche Mengen von Oxalsäure, vorwiegend als Calciumsalz, in den Boden, deren Mineralisierung während der Verwesungsprozesse bisher nicht aufgeklärt worden ist. Nach den Untersuchungen von D. Vitali (1895, zit. nach Chem. Centralbl. 1896, S. 47) sind dazu die „gewöhnlichen" Bodenbakterien nicht imstande, ebensowenig die auf abgefallenen Laubblättern lebenden und ihre Verwesung fördernden Sproßpilze, wie dies von O. Ball (1902, S. 584) nachgewiesen worden ist. Nägelis Resultate seiner wichtigen Arbeit über die Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen, die ihn zur Aufstellung seiner bekannten Theorie über den Nährwert von Kohlenstoffverbindungen als Ausdruck ihrer chemischen Konstitution veranlaßten, wirkten auch nicht ermunternd auf etwaige Untersuchungen über die Schicksale der oxalsauren Salze im Boden. Immer wieder begegnen wir in der Literatur, wenn von der Oxalsäure als Nährquelle gesprochen wird, der Behauptung, daß sie von den Organismen nicht verwendet werden könne.

Von älteren Arbeiten, die auch die Oxalsäure als Kohlenstoffquelle für niedere pflanzliche Organismen behandeln, sind außer den Untersuchungen Naegelis (1882), der auf 0,3 proz. und 1 proz. Lösungen von oxalsaurem Ammon keine Mikroorganismenvegetation zu erzielen vermochte, vor allem diejenige von A. Béchamp (1870, S. 69) zu erwähnen, der auf 3,25 proz. Lösungen von oxal-

saurem Ammon Wachstum von Pilzen und Bakterien beobachtet hat. Im günstigsten Falle erzielte er in zwei Litern Kulturflüssigkeit mit 65 g oxalsaurem Ammon eine Pilzdecke, deren Trockengewicht 0,08 g betrug; während der $^1/_2$jährigen Kulturdauer wurde die Nährlösung in dem Grade alkalisch, daß 2 g Oxalsäure zu deren Neutralisation verwendet werden mußten, ein Umstand also, welcher sehr für einen Verbrauch der Oxalsäure durch die Organismen spricht. Außerdem entstand in der Kultur noch etwas Essigsäure und 0,3 ccm Alkohol, was insofern auffallend ist, als Béchamp dieselben Stoffe auch in einer Kultur auf destilliertem Wasser (!) gleichfalls nachgewiesen hat.

Auch Werner (1872) und besonders Blaß (1873, S. 306) beobachteten in einer 0,4proz. Oxalsäurelösung geringe Pilzflocken und eine Abnahme der Oxalsäure. Da er aber gleichzeitig auch eine Abnahme der Oxalsäure in den danebenstehenden aufgekochten Lösungen feststellte, so könnte die Abnahme ebensogut durch Lichtwirkung hervorgerufen worden sein, da Oxalsäurelösungen bekanntlich im Lichte langsam zersetzt werden.

Aber erst O. Warburg (1886/8, S. 117) hat einwandfrei festgestellt, daß ausgewachsene *Penicillium*-Decken, in 0,15proz. Oxalsäurelösungen gebracht, die Oxalsäure fast völlig zum Verschwinden brachten. Eine Fruktifikation erfolgte jedoch nie („da die Oxalsäure kein Nährstoff sein kann") und ebensowenig ein Auskeimen von Pilzsporen auf diesen Lösungen. Hefen, die Warburg ebenfalls in den Kreis seiner Untersuchungen zog, entwickelten sich nie auf der erwähnten Lösung.

Proskauer und Beck (1894, S. 151) geben an, daß Oxalsäure für den *Bacillus tuberculosis* R. Koch eine geeignete Kohlenstoffquelle sei. Was aber die beiden Forscher zu einem derartigen Schlusse hat führen können, ist nicht ersichtlich, da sie ihren Nährlösungen stets noch 1,5 % Glyzerin zusetzten und obendrein keine Bestimmung der Oxalsäure vor und nach Ablauf der Versuche vorgenommen haben. Übrigens geben sie ja selbst an (S. 145), daß in Parallelversuchen mit und ohne Glyzerinzusatz sogar Rohrzucker ohne gleichzeitige Glyzeringabe völlig wirkungslos geblieben ist. Es hat sich offenbar in den Versuchen der genannten Forscher nicht um die Wirkung der Oxalsäure, sondern um die Wirkung des an Oxalsäure gebundenen Ammons gehandelt.

Mehrere Forscher der letzten Jahre, welche sich mit der Oxalsäure als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen zwar nicht ein-

gehender beschäftigt, sie jedoch hin und wieder zum Vergleich mit anderen Kohlenstoffquellen herangezogen haben, geben an, daß die Oxalsäure in einigen Fällen immerhin eine, wenn auch sehr ungeeignete Nährquelle repräsentiere.

So fand Beijerinck (1901, S. 37), daß Ureum-spaltende Bakterien in einer 1 proz. Ammonoxalatlösung in seinen Anhäufungsversuchen ungefähr 2 % des Ureums gespalten hatten. Leider fehlt aber auch hier eine Angabe über die Abnahme des zugesetzten Ammonoxalats, was um so bedauerlicher ist, als gerade Harnstoffbakterien nur sehr geringe Mengen von Nährstoffen brauchen, um sehr große Quantitäten von Harnstoff zu hydrolysieren.

Löhnis und Pillai (1906, S. 762) haben auf 1 proz. Kaliumoxalatlösungen eine geringe Stickstoffbindung beobachtet. Sie benutzten jedoch zu ihren Versuchen über die Stickstoffbindung bei Darreichung verschiedener Kohlenstoffquellen Lösungen aus Bodenextrakt, dem noch zwecks Infektion 10 % (!) Erde zugesetzt wurde. Es scheint mir nicht zulässig, aus derartigen Versuchen auf die Nährfähigkeit der Oxalsäure für stickstoffbindende Organismen zu schließen.

Ein Schüler von Löhnis, Bierema (1909, S. 19) verwendete in seinen Versuchen oxalsaures Ammon als Stickstoffquelle neben Milchzucker als Kohlenstoffquelle. Als Stickstoffqelle erwies sich das Ammonoxalat gut brauchbar; bei dessen alleiniger Anwendung entwickelte sich aber in seinen Versuchen „überhaupt nichts". Eigentümlich bleibt trotzdem seine Beobachtung, daß diese Lösungen eine alkalische Reaktion annahmen, was gerade für eine Zersetzung des Ammonoxalats, wenn auch nicht für dessen Verarbeitung, sprechen würde.

F. Tobler (1911, S. 10) vermutet, daß bei Flechten die Alge unter gewissen Verhältnissen die vom Pilz gebildete Oxalsäure aufzehrt, ohne jedoch seine Vermutungen durch Versuche zu stützen. Er beruft sich dabei im allgemeinen auf O. Treboux (1905, S. 434), der auf 11 verschiedenen organischen Säuren als Kohlenstoffquellen, darunter auch auf Oxalsäure, 40 Algenarten kultivierte. Über die Eignung der Oxalsäure als Kohlenstoffquelle spricht sich Treboux jedoch gar nicht aus, woraus man zu schließen berechtigt ist, daß er auf Oxalsäure kein Algenwachstum beobachtet hat.

Czapek (1905, S. 300) gibt als Resultat seiner Untersuchungen über die Eignung von Kohlenstoffquellen für *Aspergillus* an, daß

dieser Pilz auf oxalsaurem Ammon in drei Wochen bei 28° 0,002 g Trockensubstanz gebildet habe, was ja nicht gerade für die Eignung der Oxalsäure als Kohlenstoffquelle spricht.

Andere Forscher fanden, daß die von ihnen gezüchteten Organismen die Oxalsäure nicht zu verarbeiten vermochten. So z. B. Maaßen (1896, S. 381), der in dieser Richtung 52 Bakterienarten geprüft hat, ferner Salzmann (1902, S. 55), der *Streptothrix*-Arten daraufhin untersucht hat, sowie die schon anfangs zitierten Vitali und Bail.

Nach Warburg verdanken wir erst C. Wehmer (1891) die ersten sicheren Angaben über die Veratmung der Oxalsäure. Anläßlich seiner Arbeit über die Bildung von Oxalsäure durch Schimmelpilze konnte er feststellen, daß diese die von ihnen als intermediäres Atmungsprodukt gebildete Oxalsäure auch weiter zu veratmen vermögen, sobald letztere in den Kulturen nicht als unlösliches Salz festgelegt wird. Auch auf Lösungen von Oxalsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle konnte er beim Hineinbringen schon entwickelter *Aspergillus*- und *Penicillium*-Decken eine Abnahme der gegebenen Oxalsäuremenge feststellen. In je einem Falle, da er *Aspergillus* und *Penicillium* während 107 Tagen kultivierte, verschwand sogar die ganze zugesetzte (allerdings nur 0,2 g krist. Oxalsäure) Oxalsäuremenge. Allerdings keimten Sporen von *Aspergillus* auf diesen Lösungen nicht aus, und auch das Gewicht der gebildeten Trockensubstanz war sehr gering, bei *Penicillium* z. B. nur 0,002—0,0035 g.

Auch einige Tierphysiologen, wie z. B. Zuntz (1898) haben eine Abnahme der in angesäuerten Rübenschnitzeln ursprünglich vorhandenen Oxalsäuremenge konstatiert, kürzlich auch Tangl und Weiser (1911), und zwar bis zu 70 %.

II. Morphologie des *Bacillus extorquens* Bassalik[1]).

In den Exkrementen des Regenwurmes (Lumbricus terrestris L.) sah ich Oxalatdrusen, die wahrscheinlich aus den durch den Regenwurm verzehrten Blättern stammten, sich jedoch durch eigentümliche Corrosionen von den in lebenden Blättern enthaltenen Drusen deutlich unterschieden. Dieser Umstand veranlaßte mich, nach

1) Kurz erwähnt in meiner Arbeit „Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien", Zeitschr. f. Gärungsphysiol., Bd. II, S. 1.

etwaigen Mikroorganismen zu suchen, die Oxalsäure zu zersetzen vermögen. Dabei kam von vornherein nur eine Versuchslösung in Betracht, die Oxalsäure als alleinige Kohlenstoffquelle aufwies.

Sie enthielt im dest. Wasser:

0,1 % Dikaliumphosphat;
0,1 % Ammonsulfat;
0,025 % Magnesiumsulfat;
Spur Ferrichlorid und außerdem entweder
1 % Kalium- oder Ammonoxalat.

Mit obiger Nährlösung wurde eine Anzahl Kölbchen beschickt, mit geringen Mengen jener Regenwurmexkremente beimpft, welche die corrodierten Oxalatdrusen enthalten hatten, und bei Zimmertemperatur aufgestellt. Schon nach 5 Tagen bildeten sich am Boden der Versuchsgefäße rosafarbene, dicke, zähe Bakterienhäute. Auf gleich zusammengesetzte Lösungen reiner Merckscher Chemikalien (mit oxalsaurem Ammon als alleiniger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle) wuchsen nach Impfung wieder dieselben charakteristischen Bakterienhäute. Die mikroskopische Durchmusterung dieser Häute ergab, daß sich darin neben einem kurzen, plumpen mittelgroßen Bazillus noch drei andere Stäbchen befanden. Isolierungsversuche mittels Agarplatten verliefen ergebnislos, indem keiner der darauf sich entwickelnden Bazillen auf Oxalatlösung zu wachsen vermochte. Schließlich gelang es nach vielfachen Mißerfolgen, den Bazillus von Kieselsäureplatten mit oxalsaurem Ammon als Nährquelle zu isolieren. Er wurde dann auf Gelatine weitergezüchtet und zu allen weiteren Untersuchungen verwendet.

Da der betreffende Bazillus mit keinem der bisher beschriebenen identisch ist, lasse ich vorerst eine Beschreibung seiner morphologischen Eigenschaften und kulturellen Besonderheiten folgen:

Der *Bacillus extorquens* ist ein meist 3 μ langes und 1,5 μ breites, öfters ein wenig gebogenes, an den Enden abgerundetes Stäbchen, das im ganzen einen plumpen Eindruck macht. Die angegebenen Maße beziehen sich auf lebend gemessene Stäbchen und stellen nur Mittelwerte dar, da die Länge der Stäbchen zwischen 2—4 μ und deren Breite zwischen 1 und 2 μ schwankt. In den meisten Kulturen findet man nämlich viele Stäbchen, die nur wenig länger als breit sind. Meist kommt der Bazillus einzeln vor, seltener zu zweien oder höchstens zu dreien, doch bildet er nie eigentliche Fäden. In flüssigen Nährmedien kann man oft Stäbchen von der dreifachen Länge beobachten, ohne daß man in

schwacher wässeriger Methylenblaulösung Querwände erkennen könnte.

Die Beweglichkeit ist wenig lebhaft und überhaupt nur an jungen Stäbchen und meist nur an verhältnismäßig wenigen Individuen wahrnehmbar. Sie wird durch eine polare Geißel bedingt. Die Geißelfärbung läßt sich allerdings nur schwierig ausführen; gute Präparate zeigen eine schwache, ungefähr dreimal körperlange Geißel.

Sporenbildung konnte weder auf flüssigen, noch auf festen Substraten, wie Peptonagar, Blattdekokt- und Tanninagar, Kieselsäuregallerte und dialysiertem Agar mit oxalsaurem Ammon, Gelatine u. dergl., erzielt werden.

Die polare Begeißelung und der Mangel einer Sporenbildung sind Merkmale, die diesen Organismus nach A. Fischer zu *Bactrinium*, nach Migula zu *Pseudomonas* verweisen; die herrschende Anarchie auf diesem Gebiete läßt es aber zwecklos erscheinen, Stäbchen anders als „Bazillus“ zu bezeichnen.

Auf Gelatineplatten wächst der Bazillus äußerst langsam. Frühestens nach 7 Tagen sieht man winzige, die Gelatine nie verflüssigende Oberflächenkolonien, die selten einen Durchmesser von 1 mm erreichen, platt, rund und zähe sind und nach dem Rande zu meist dünner werden; dieser ist stets glatt und weist nie irgendwelche Ausbuchtungen auf. Bei einer ca. 50fachen Vergrößerung erscheinen die Kolonien gelb bis braun gleichmäßig stark punktiert, wobei aber der Rand nicht scharf von der umgebenden Gelatine abgegrenzt ist. Die Oberflächenkolonien, die anfänglich eine schmutziggelbe bis gelbrötliche Färbung aufweisen, werden mit der Zeit schön blutrot. Innenkolonien dagegen, die man auch nach mehreren Wochen nur als winzige runde Pünktchen in der Gelatine bemerkt, zeigen eine schmutzigweiße bis gelbliche Färbung.

In Gelatinestichkulturen entwickelt der Bazillus eine gleichmäßig dicke, kleine, zähe, flache, runde und mit der Zeit blutrot werdende Auflage (einen typischen „Nagelkopf“) und einen ziemlich starken, nach unten zu sich jedoch verjüngenden, aus linsenförmigen winzigen Kolonien bestehenden Stich. Die Färbung nimmt nach unten zu von rot über gelb nach schmutzigweiß rasch ab. Manchmal beobachtet man auf Gelatinestichkulturen einen von der Einstichstelle sich oft über die ganze Gelatineoberfläche verbreitenden weißlichen, äußerst zarten Schleier, wie ich ihn ähnlich nur bei Tataroff (1891, S. 67 [bei seinem „karminroten Bazillus“]) beschrieben fand.

Auf Agar entwickeln sich noch bedeutend langsamer als auf Gelatine kleine, runde, sehr dünne, meist völlig farblose Kolonien, die denjenigen auf Gelatine in ihrer inneren Struktur völlig gleichen. Ausstrichkulturen auf schrägem Peptonagar waren bei Beginn meiner Untersuchungen stets farblos und dabei so dünn, daß sie kaum wahrgenommen werden konnten, dabei aber äußerst zähe, so daß man mit der Platinnadel den ganzen Belag auf einmal abheben konnte. Im Laufe der Zeit jedoch, wohl infolge einer gewissen Anpassung an die Peptonnährböden, entwickelten sich auch auf Agar üppigere rosafarbene „Striche“ mit glatten oder feingekerbten Rändern. Das Kondenswasser wird nur selten ein wenig getrübt, worauf sich ein schwacher rosafarbener, „sandiger“ Bodensatz absetzt; meist aber bildet sich unter dem Kondenswasser ein zähes Häutchen.

Auf Oxalatlösungen und anderen flüssigen Nährmedien wächst der Bazillus in zähen Häuten am Boden und von da aus manchmal auch an den Wänden der Versuchsgefäße hinauf, während die darüber stehende Flüssigkeit schon nach 24 Stunden völlig klar ist. Allerdings habe ich auf Fumar- und Bernsteinsäure-, ferner auch auf Glyzerin- und Methylalkohollösungen öfters auch Oberflächenhäute beobachtet, die aber stets sehr dünn und wenig zähe waren. Von unzähligen Oxalatkulturen sah ich nur in zweien dünne Oberflächenhäute, so daß das häutige Wachstum des Bazillus auf dem Boden der Kulturgefäße ein sehr charakteristisches Merkmal dieser Spezies ist.

Das Wachstum des Bazillus auf Oxalatlösungen erfolgt, im Gegensatz zu dem auf Gelatine und Agar, sehr schnell; nach 24 Stunden bilden sich schon recht ansehnliche Häute.

Bei einer Temperatur von 37° wächst der Bazillus schlecht; bei Zimmertemperatur und bei 25—30° kann man jedoch keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit bemerken.

Wie man von vornherein aus dem Tiefenwachstum des Bazillus auf Gelatine und in flüssigen Nährmedien, besonders auf Oxalatlösungen, schließen kann, ist sein Sauerstoffbedürfnis nicht sehr stark. Unter abgesperrten Glasglocken entwickelte er sich in Oxalatlösungen noch bei der halben Sauerstofftension der Luft völlig normal; bei noch tieferer Sauerstoffspannung verlangsamt und verringert sich sein Wachstum jedoch sehr merklich. Unter anaëroben Bedingungen vermag er sich nicht zu entwickeln.

Milch wird nicht koaguliert, die Reaktion wird alkalisch, das Wachstum ist gering.

Auf Kartoffel wächst er gleichfalls sehr langsam und schlecht, wobei die ganze Kartoffel dunkel verfärbt wird.

Wenig empfindlich ist der Bazillus gegen alkalische Reaktion der Nährböden. Noch in einer 0,015 norm. Natronlauge (ca. $^1/_{15}$ %) entwickelt sich der Bazillus recht gut, nur schwach dagegen bei einer Konzentration von 0,02 norm. Darüber hinaus erfolgt kein Wachstum mehr.

Die große Resistenz gegenüber alkalischer Reaktion der Nährsubstrate stellt ohne Zweifel eine Anpassung dieses Organismus vor, da bei der von ihm vollzogenen Verarbeitung von oxalsauren Salzen stets eine starke alkalische Reaktion entsteht.

Sehr empfindlich ist jedoch *Bacillus extorquens* gegen Säuren. In einer 0,0005 norm. Salzsäure (ca. $^1/_{600}$ %) vermag er sich nicht mehr zu entwickeln.

Als ein weiteres Charakteristikum des Stäbchens mag seine sehr deutliche und leichte Plasmolysierbarkeit erwähnt werden, ferner eine schon in 3 Tage alten Kulturen auftretende Körnigkeit.

Auf Oxalatlösungen scheint er Glykogen zu bilden; doch ist die einwandfreie Feststellung bei der geringen Größe der Zellen sehr schwierig.

An dieser Stelle möchte ich auf eine besondere Eigentümlichkeit dieses Bazillus hinweisen. Es wurden nämlich in älteren flüssigen Kulturen auf Calciumoxalat, besonders aber auf abgefallenen Laubblättern, sehr viele Stäbchen beobachtet, deren Membran dick und sehr stark lichtbrechend war. Dies bedingte eine starke Größezunahme der Stäbchen, die außerdem fast nie in den zähen Häuten eingeschlossen waren, sondern einen besonderen „sandigen“ Bodensatz bildeten. Anfänglich vermutete ich, daß ich es hier mit „Arthrosporen“ im Sinne de Barys zu tun habe. Da jedoch ein Auskeimen derselben weder in Tröpfchenkulturen noch auf Agar unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte, lag der Gedanke nahe, daß es sich um Inkrustationen irgendwelcher Art handle. Diese stark lichtbrechenden Stäbchen wurden nun auf Deckgläsern unter dem Mikroskop mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelt. Sie lösten sich hierbei stets in verdünnten Säuren, am promptesten in schwacher Salzsäure.

Nach der Säurebehandlung verblieben Stäbchen von gewöhnlicher Größe und Aussehen und mit gleichem Lichtbrechungsvermögen

wie die normalen Stäbchen übrig; nur erschienen sie etwas stärker gekörnt, etwa wie Stäbchen in ganz alten Kulturen. Die untenstehende Abbildung (Fig. 1), deren Umrisse mit dem Abbeschen Zeichenapparat aufgenommen worden sind, verdeutlicht dies besser als eine Beschreibung.

Der die Inkrustierung bedingende säurelösliche Stoff wurde in der Weise untersucht, daß größere Mengen dieser Stäbchen in dest. Wasser ausgewaschen und abzentrifugiert, hierauf auf einen Objektträger gebracht und mit schwacher Essigsäure bis zum Verlust des Glanzes behandelt wurden. Nach Zugabe von oxalsaurem Ammon bildeten sich meist quadratoktaedrische, oft sehr schön ausgebildete, kleine Kristalle; das Inkrustat muß sonach aus einer Calciumverbindung bestehen. Schwieriger ist es aber, die Säure des inkrustierten Salzes festzustellen. Da mir überhaupt nur verhältnismäßig geringe Mengen der inkrustierten Stäbchen zur Verfügung standen, konnte ich die Natur der Säure nicht mit voller Sicherheit feststellen. Sicher ist es nicht Schwefelsäure, wahrscheinlich auch nicht Phosphorsäure, da die Reaktion mit molybdänsaurem Ammon in Salpetersäure meist undeutlich und auch nicht immer eintrat; wo die Reaktion erfolgte, könnte sie ja auch von organisch gebundenem Phosphor der Leibessubstanz der Bakterien hervorgerufen sein. Es scheint mir aber am wahrscheinlichsten, daß es sich um Kohlensäure handelt, obwohl ich Gasbläschenbildung nach Säurezusatz nicht sicher beobachtet habe. Die schnelle Löslichkeit in verdünnter Essigsäure spricht aber eher für Kohlensäure als für Phosphorsäure.

Fig. 1. 1 : ca. 1000.
a Inkrustierte Stäbchen. b Dieselben, nach Säurebehandlung.

Die inkrustierten Stäbchen sind allem Anschein nach sämtlich schon tot. Es gelang mir nämlich nie, nach langsamem Auflösen in sehr schwacher Essigsäure und nachherigem sofortigem Auswaschen mit sehr schwacher Ammoniaklösung oder Natronlauge oder auch reinem sterilisiertem Wasser die von der Inkrustation befreiten Stäbchen wieder zum Wachstum zu bringen, ebensowenig wie die inkrustierten. Auch ließen sich die sehr vorsichtig von der Inkrustation befreiten Stäbchen nicht mehr plasmolysieren.

Meine Versuche, an lebenden Bakterien durch Behandlung mit verschiedenen verdünnten Calciumsalzlösungen oder mittels schwachem

Calciumhydroxyd derartige Inkrustationen zu erzielen, schlugen fehl. In der Natur scheinen aber solche Inkrustationen von Bakterien ziemlich verbreitet zu sein, wie ich an vielen Präparaten von Erdproben mit Bakterien beobachten konnte. In manchen Erdproben mit starkem Kalkgehalt sieht man fast in jedem Präparat einige Stäbchen mit starkem Lichtbrechungsvermögen, die bei Säurebehandlung ihren Glanz verlieren.

Der Inkrustationsprozeß wird sich wahrscheinlich auf folgende Weise abspielen: in calciumsalzhaltigen Lösungen wird sich die mehr oder weniger schleimige Membran der Bakterien mit dem Calciumsalz imbibieren. Durch Aufzehrung der Säure, z. B. von Salpetersäure oder einer organischen Säure bilden sich dann in und an der Membran Ausfällungen von Calciumkarbonat. Finden die Lebensprozesse mit voller Intensität statt, so wird durch das immer wieder ausgeatmete Kohlendioxyd das Calciumkarbonat gelöst. Mit Abnahme der Atmungsintensität jedoch, z. B. infolge ungünstiger Lebensbedingungen, genügt das ausgeschiedene Kohlendioxyd nicht mehr, um das Calciumkarbonat in das lösliche Dikarbonat überzuführen; vielmehr bilden sich feinste Niederschläge dieses Salzes in der Membran, wodurch die Inkrustation zustande kommt und der Organismus schließlich abstirbt.

Ich schließe dies alles daraus, weil die Calciumkarbonatbildung in jungen Kulturen verschiedener Bakterien, denen Calciumnitrat als alleinige Stickstoffquelle geboten wird, durchaus anders aussieht, als in älteren Kulturen. In jungen Kulturen bemerkt man nach einiger Zeit um mehrere zusammengeklebte Stäbchen große Kalkkonkremente entstehen, die meist radiären Bau, jedoch nie eine deutlich kristallinische Struktur aufweisen. Mit dem Alter der Kultur werden die gebildeten Konkremente immer kleiner, sie scheiden sich immer dichter bei der Membran aus, so daß schließlich ungleichmäßig breite und dicke kurze Scheiden entstehen. So regelmäßige und schöne Inkrustationen, wie ich sie bei *Bacillus extorquens* durch spontane Entstehung in Blatt- oder Calciumoxalatkulturen beobachtet habe, konnte ich jedoch in Kulturen mit bestimmten Konzentrationen von Calciumnitrat niemals erzielen.

Inkrustationen von Bakterien hat schon früher Wortmann (1900, S. 674) beobachtet. Die Inkrustationen Wortmanns sind aber völlig anderer Art als die von mir bei *Bacillus extorquens* beobachteten, da sie aus „Bitterstoffen“ des Weines bestehen und sich schon beim Erwärmen, ebenso in Alkohol, Speichel u. dgl. lösen.

Da es sich beim *Bacillus extorquens* um echte Kalkinkrustationen handelt, verwende ich für sie die Bezeichnung „Bakteriosklerose", die mir Prof. Alfred Fischer vorgeschlagen hat. Über diese Bildungen gedenke ich noch an anderer Stelle ausführlicher zu berichten.

III. Fähigkeit verschiedener niederer Organismen zur Oxalatverarbeitung.

1. Prüfung von 90 Bakterien- und Pilzspezies auf die Befähigung zur Oxalatverarbeitung.

Zunächst suchte ich festzustellen, ob außer dem *Bacillus extorquens* etwa noch andere Boden- oder auf Pflanzen lebende Bakterien und einige weitverbreitete Pilze imstande sind, die Oxalsäure als Kohlenstoffquelle zu verwenden.

In diesem Versuch kam folgende Nährlösung zur Verwendung:

1000 g dest. Wasser,
2,5 g oxalsaures Ammon,
1,0 g Monokaliumphosphat,
0,2 g Magnesiumsulfat,
0,1 g Natriumchlorid,
Spur Ferrosulfat, dazu noch
0,5 g Kaliumnitrat[1]).

Diese Nährlösung wurde mit Ammoniak neutralisiert, in Erlenmeyerkölbchen abgefüllt und an drei aufeinander folgenden Tagen im Dampftopf je 15 Min. lang bei ca. 80° sterilisiert.

Stets wurden drei Kölbchen mit derselben Organismenart beimpft und zwar mit Reinkulturen des

Bacillus extorquens, mycoides, subtilis, vulgatus, tumescens, megaterium, fluorescens, pyocyaneus, coli, prodigiosus, anthracis;
Bacterium chrysogloea, luteum, turcosum, Zopfii;
ferner mit zwei Milchsäurebakterien;
drei *Streptothrix- (Actinomyces-)*arten *(alba, chromogena* und *aurantiaca);*
mit *Diplococcus roseus;*
Micrococcus candicans;
Sarcina alba, aurantiaca;

1) Alle in obiger Arbeit verwendeten Chemikalien stammten entweder von Merck, Darmstadt, oder Kahlbaum, Berlin.

mit einer Rosahefe und einer Bierhefe, mit Rohkulturen von Essigsäurebakterien und mit Reinkulturen von 61 aus Boden und von Laubblättern u. dgl. isolierten, aber nicht bestimmten Bakterienarten, ferner mit Reinkulturen von *Macrosporium* und *Hormodendron* (mit jungen Mycelflocken aus Zuckerlösungen, da die Sporen nicht auskeimen wollten), wobei die Nährlösung für die beiden letzteren mit Oxalsäure schwach angesäuert wurde.

Diese Kulturen wurden nun mindestens einen Monat lang beobachtet. Das Resultat war, daß keiner der genannten Mikroorganismen, mit Ausnahme des *Bacillus extorquens*, auf dieser Nahrlösung sich nennenswert zu entwickeln vermochte. Allerdings entstanden in den Kulturen zweier aus dem Boden reingezüchteter Bazillen ziemlich ansehnliche Trübungen und auch die weiße *Streptothrix* bildete auf der Nährlösung kleine Räschen; da sich aber sowohl die beiden Stäbchen als auch die *Streptothrix* bei weiteren Uberimpfungen auf Oxalatlösungen stets nur kümmerlich entwickelten, wurden sie von weiteren Versuchen (mit Ausnahme eines später zu berichtenden Falles) über die Oxalsäureverarbeitung ausgeschlossen.

Vor dem Abbruch dieses Versuches wurde die Nährlösung der einzelnen Kulturen in gleichen Portionen in Reagenzgläser verteilt und durch Calciumchloridzusatz die Oxalsäure als Calciumsalz gefällt. Überall waren die Niederschläge sehr stark, nur in den erwähnten getrübten Kulturen der beiden Bazillen und in der Kultur der weißen *Streptothrix* geringer. In der Kultur des *Bacillus extorquens* war nur ein Calciumphosphat- und Karbonat-Niederschlag vorhanden, was daraus hervorging, daß er sich in Essigsäure glatt löste.

Dieser Versuch hat sonach ergeben, daß von allen untersuchten Mikroorganismen, abgesehen von *Bacillus extorquens*, nur drei die Oxalsäure im geringen Maße zu verarbeiten vermochten.

2. Vergleichskulturen zwischen *Bacillus extorquens*, *Aspergillus* und *Penicillium*.

Mit einer Versuchslösung von derselben Zusammensetzung wie die im vorigen Versuch angewandte, nur unter Weglassung des Kaliumnitrats, wurden Vergleichskulturen von *Bacillus extorquens* mit den von C. Wehmer auf Oxalsäure-, resp. Oxalatlösungen kultivierten *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* angestellt. Da aber die Sporen auf obiger Lösung nicht auskeimten, wurden

junge, mit sterilisiertem Wasser von Zucker befreite Mycelräschen in die Nährlösung gegeben. Während *Bacillus extorquens* sich in der genannten Nährlösung schnell und gut entwickelte, zeigten die Mycelräschen der beiden Pilze sogar nach vier Monaten nur eine sehr schwache Größenzunahme; eine Fruktifikation war auch nicht erfolgt.

Da die Vergleichskulturen in zahlreichen Gefäßen ausgeführt wurden, konnten von Zeit zu Zeit einige derselben zu vergleichenden Ausfällungen des Calciumoxalats benutzt werden Während nun die in Essigsäure unlöslichen durch Calcium-Chlorid oder -Acetat verursachten Niederschläge in den Kulturen des *Bacillus extorquens* nach zweiwöchentlicher Versuchsdauer höchstens minimal ausfielen, waren sie in den Pilzkulturen noch sehr stark. Dieselbe Operation wurde dann nach ein-, zwei-, drei- und viermonatlicher Versuchsdauer wiederholt. Unterdessen erhielten die Kulturen des *Bacillus extorquens* oftmalige Oxalsäuregaben zwecks Neutralisation der fortwährend entstehenden stark alkalischen Reaktion und zum Ersatz der verarbeiteten Oxalsäure, daneben noch einmal je 0,1 g oxalsaures Ammon. Trotzdem war nach vier Monaten in den Kulturen des *Bacillus extorquens* keine Spur mehr von Oxalat nachzuweisen, während die Fällungen in den Pilzkulturen noch ziemlich stark waren, obwohl unterdessen ein Fortschritt im Wachstum der Mycelien nicht zu verkennen war.

Lösungen, die mit Oxalsäure angesäuert worden waren, ergaben für die Pilze ähnliche Resultate, dagegen entwickelte sich auf ihnen *Bacillus extorquens* nicht.

Der obige Versuch zeigt also, daß *Aspergillus* und *Penicillium* im Vergleich mit *Bacillus extorquens* das gebotene Oxalat nur sehr schwach zu zersetzen vermögen.

IV. Der Vorgang der Lösung schwerlöslicher Oxalate.

1. Mikroskopische Beobachtung der Lösung von Kristallen schwerlöslicher Oxalate.

Auf das sterile Deckglas kleiner, zur längeren mikroskopischen Beobachtung überaus geeigneter Kästchen von Spiegelglas wurden sterilisierte Calciumoxalatkristalle in Winogradskische Mineralösung (unter Weglassung des Natriumchlorids) gelegt und mit einer Rohkultur des *Bacillus extorquens* beimpft. Zehn besonders

gut ausgebildete, größere Kristalle wurden unter dem Mikroskop eingestellt und täglich beobachtet, Vom dritten Tage an konnte man an den Kristallen eine Abnahme von Glanz und Glätte wahrnehmen. Unterdessen vermehrten sich die Bakterien stärker und ordneten sich, wohl infolge chemotaktischer Anziehung, um die einzelnen Kristalle in Form regelmäßiger Strahlen an. Am fünften Tage nach Versuchsbeginn bemerkte ich an den Kristallen teils schwächere, teils sehr starke Sprünge und Vertiefungen; am neunten Tage war der erste Kristall völlig gelöst. Nun dauerte es nur noch zwei Tage, bis auch der letzte Kristall gelöst war; dabei hatte sich die Anzahl der Bakterien stark vermehrt.

Fig. 2 a. (1 : 300.) Calciumoxalatkristall.

a 3 Tage nach der Impfung; die Bakterien sind strahlenförmig angeordnet.

b 5 Tage nach der Impfung; ein Sprung links im Kristall, kleine Grübchen an den Kanten (die Bakterien nicht eingezeichnet).

c 6 Tage nach der Impfung; starke Sprünge; in der Mitte regelmäßig angeordnete längliche Gruben; an den Seiten rundliche Grübchen (Bakterien nicht eingezeichnet).

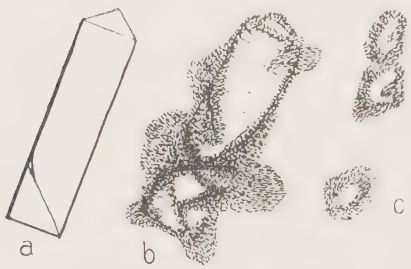

Fig. 2 b. (1 : 300.)
Calciumoxalatkristall aus Zwiebelschale.

a Sofort nach der Impfung mit *Bacillus extorquens*.

b 24 Stunden später; der Kristall, besonders an den Sprungstellen, dicht mit Bakterien umgeben.

c Weitere 24 Stunden später. Kristallreste, von Bakterien umgeben.

In einem anderen, mit vier Calciumoxalatkristallen beschickten Glaskästchen, das mit einer Reinkultur des *B. extorquens* beimpft war, verschwanden die Kristalle schon am sechsten Tage (vgl. Fig. 2 a).

Einige aus Zwiebelschalen herauspräparierte, große und schön ausgebildete monokline Calciumoxalatkristalle zeigten schon am nächsten Tage starke Korrosionen und Risse, und waren, besonders an den Rißstellen, über und über mit Bakterien dicht besetzt. Die Lösung der Kristalle war schon am dritten Tage vollendet (vgl. Fig. 2 b).

In einem vierten Kästchen wurden drei große Magnesiumoxalatkristalle ebenfalls mit einer Reinkultur des *B. extorquens* beimpft. Diese Kristalle wiesen schon am nächsten Tage überaus starke Korrosionen auf; dann blieb dieser Zustand drei Tage stationär, bis schließlich am fünften Tage alle drei Kristalle völlig

gelöst waren. Ein feiner pulveriger Niederschlag, der sich abgesetzt hatte, brauste nach Zusatz von verdünnter Salzsäure auf: er bestand somit aus Magnesiumkarbonat.

Eine weitere Kästchenkultur wurde mit Kristallen von Baryumoxalat ausgeführt. Auch hier wiesen die Kristalle, wie beim Magnesiumoxalat, schon am nächsten Tage sehr starke Korrosionen auf. Dieser Zustand änderte sich während drei weiterer Tage nicht merklich, bis dann am sechsten Tage die völlige Lösung der Kristalle unter Bildung eines pulverigen Niederschlages eintrat, der sich nach Salzsäurezusatz ebenfalls unter Gasbläschenbildung löste.

Die Lösung der schwerlöslichen Oxalate erfolgte sonach am schnellsten bei dem monoklinen Calciumsalz aus Zwiebelschalen, dann beim Magnesiumsalz, ferner beim Baryumsalz, am langsamsten beim tetragonalen Calciumsalz.

2. Zersetzung von Calciumoxalatkristallen in Pflanzengeweben.

Für diese Versuche kam eine Minerallösung von der gleichen Zusammensetzung wie die im vorigen Abschnitt erwähnte zur Verwendung.

Im November zerschnitt ich abgefallenes Laub von *Alnus*, *Acer*, *Betula*, *Carpinus*, *Corylus*, *Fagus*, *Populus*, *Quercus*, *Rosa*, *Salix*, *Tilia* und *Ulmus* in 2—10 mm breite Schnitzel und brachte davon je 5—15 g in $^1/_2$ l-Erlenmeyerkolben. Auf diese Blattschicht goß ich dann soviel von der erwähnten Minerallösung, daß diese die Blattstücke gerade bedeckte. Eine Reihe der so vorbereiteten Kolben wurde an vier aufeinander folgenden Tagen bei 100 ° je 10 Minuten lang sterilisiert. Hierauf impfte ich eine Anzahl der Kolben mit einer Reinkultur des *B. extorquens*, während ich den Rest unbeimpft ließ. Die andere Reihe wurde unsterilisiert und, wie die anderen Kolben, bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufgestellt.

Vor Beginn des Versuches wurde noch festgestellt, daß sämtliche Blätter reichlich Kalkoxalatkristalle enthielten; in manchen, besonders in *Corylus*-Blättern, waren zahlreiche Drusen vorhanden.

Die mikroskopische Kontrolle der Kulturen wurde in regelmäßigen Zeitabständen während acht Monaten fortgesetzt.

Dieser Versuch lieferte folgende Resultate:

a) Mit *Bacillus extorquens* beimpfte Blattkulturen.

Die Kulturen zeigen keine Gasentwicklung und keine sonstigen Gärungserscheinungen. Die ursprünglich neutrale Reaktion der Kulturlösung wird schwach alkalisch.

Nach vier Wochen ist eine ganz deutliche Abnahme der Calciumoxalatkristalle festzustellen und zwar derart, daß eine große Anzahl der Blattschnitzel überhaupt ganz frei davon ist. Die Blätter sind weich und lassen sich leicht zwischen den Fingern zerreiben; die Cuticula kann leicht mit einer Nadel vom ganzen Blattstück abgehoben werden. Die Bakterien haben sich stark vermehrt und haften massenhaft an den Blättern; sie bilden in einigen Gefäßen submerse zähe Häute; im Bodensatz finden sich zahlreich inkrustierte Stäbchen.

Nach weiteren vier Wochen sind in den Blättern keine Kristalle mehr zu finden; am Boden der Versuchsgefäße liegt ein feiner Kristallsand, der sich in Essigsäure unter Aufbrausen restlos löst.

Das Gewebe der Blätter ist stark gelockert, stellenweise sogar ganz auseinandergefallen. Die noch nicht zerfallenen Blattschnitzel fühlen sich schlüpfrig und schleimig an; ihre Palisadenzellen liegen unregelmäßig durcheinander.

b) Sterile Blattkulturen.

Auch nach acht Monaten ist keine Veränderung erfolgt. Die Calciumoxalatkristalle sind intakt, eine Abnahme derselben ist nicht bemerkbar. Die Struktur und die Konsistenz der Blätter ist gleich lederartig wie zu Anfang des Versuches.

c) Nichtsterilisierte Blattkulturen.

Am dritten Tage ist in den Gefäßen ein feiner Teegeruch wahrnehmbar.

Am vierten Tage tritt, bei schwach saurer Reaktion, eine ziemlich starke Gasbläschenbildung ein, die 14 Tage lang anhält; darauf wird die Reaktion alkalisch. Gleichzeitig macht sich ein schwacher Fäulnisgeruch bemerkbar. In der Flüssigkeit befinden sich verschiedene Bakterienarten; immerhin dominieren große Plectridien, darunter *Bacillus Solmsii*. Außerdem sind wenige Hefen und Pilzsporen mit Keimschläuchen vertreten. Nun tritt Ammoniakgeruch auf.

Nach drei Wochen dominiert der Ammoniakgeruch über dem Fäulnisgeruch. Man bemerkt nun zahlreiche Protozoen. Unter den Bakterien, die ich mit Hilfe der Plattenmethode zu isolieren

versuchte, bemerkt man in den meisten Versuchsgefäßen die plumpen, leicht erkennbaren Formen des *Bacillus extorquens.*

Nach fünf Wochen ist der Fäulnisgeruch nur noch sehr schwach, der Ammoniakgeruch dagegen sehr stark. Impfungen aus den Versuchsgefäßen auf Nährlösungen mit Ammonoxalat ergeben aus den meisten Kolben die Entwicklung der charakteristischen submersen Häute des *B. extorquens.* In den Blättern macht sich eine allgemeine Abnahme der Calciumoxalatkristalle bemerkbar, jedoch ist dies nicht in allen Kolben in gleichem Maße der Fall.

Nach acht Wochen ist das Blattgewebe sehr stark gelockert, die Blätter sind dunkel verfärbt, weich, schleimig und fühlen sich schlüpfrig an, sie sind im ganzen noch stärker verändert als in den mit *B. extorquens* beimpften Kulturen. Der Fäulnisgeruch wird noch geringer, in den meisten Gefäßen ist er überhaupt nicht mehr wahrnehmbar. Die Mehrzahl der Blätter ist völlig oxalatfrei und am Boden der Gefäße findet sich ein ziemlich starker Satz von Bakteriensporen, inkrustierten Formen des *B. extorquens* und feinem Kristallsand.

Schließlich blieben die Calciumoxalatablagerungen der Blätter nur in zwei von den acht Versuchsgefäßen dieser Serie unverändert, obwohl die Blätter eine gleich starke Dunkelfärbung und Lockerung des Gewebes aufwiesen.

Dieser Zustand blieb dann sechs Monate stationär.

Es mag hier noch bemerkt werden, daß in keiner der besprochenen Kulturen eine nennenswerte Schimmelpilzentwicklung wahrzunehmen war.

Von den verschiedenen Blattarten erfuhren diejenigen von *Corylus* und *Carpinus* die stärkste Zersetzung und zeigten die Auflösung der Calciumoxalateinlagerungen zuerst, länger widerstanden diejenigen von *Quercus,* am längsten die von *Fagus.*

Reinkulturen anderer Mikroorganismen auf Blättern.

Sterilisierte Blattkulturen (vgl. S. 270), die während drei Monaten keinerlei Veränderung an den Blättern erkennen ließen, wurden mit Reinkulturen von *Aspergillus niger, Penicillium glaucum, Streptothrix odorifera* und zum Vergleich mit *Bacillus extorquens* beimpft. Da die beiden Schimmelpilze nach vier Wochen nur eine schwache Entwicklung zeigten, wurde ihren Kulturen Zucker zugesetzt, welcher sofort ein üppiges Wachstum beider Pilze hervorrief.

Nach weiteren vier Wochen ließ sich jedoch weder in den Kulturen der Schimmelpilze noch in der von *Streptothrix* eine Abnahme der Calciumoxalatkristalle in den Blättern bemerken. In den Kulturen mit *B. extorquens* dagegen waren die meisten Kristalle schon verschwunden.

Nach acht Wochen zeigen die Blätter in den Pilzkulturen starke Lockerung und Erweichung, jedoch scheinen die Calciumoxalatablagerungen in unverminderter Menge vorhanden zu sein. In den *Streptothrix*-Kulturen dagegen sind die Blätter weit weniger verändert, obwohl sich die *Streptothrix* reichlich vermehrt hat; aber auch hier sind die Kristalle der Blätter in anscheinend unverminderter Menge vorhanden. Hingegen sind nunmehr in den *B. extorquens*-Kulturen keine Oxalatkristalle mehr zu finden; die Blätter zeigen auch hier starke Erweichung, jedoch keine Veränderung ihrer Farbe.

Auch nach vier Monaten, bei Abbruch des Versuches, war in den mit den Schimmelpilzen und *Streptothrix* beimpften Kulturen noch keinerlei wahrnehmbare Abnahme der Calciumoxalatkristalle festzustellen.

e) Kulturen auf Holundermark.

Holundermark wurde in Würfel geschnitten, in eine Lösung von Kaliumoxalat und nach einiger Zeit in schwache Lösungen von Calciumchlorid oder -nitrat gebracht. Auf diese Weise konnte innerhalb der Holundermarkzellen ein regelmäßiger Kristallsand von Calciumoxalat erzeugt werden. Hierauf spülte ich die Würfel in sterilisiertem dest. Wasser gründlich ab, schnitt die obersten Schichten mit einem Rasiermesser vorsichtig weg, brachte die Würfel in Kölbchen mit Winogradskischer Minerallösung und sterilisierte. Eine Reihe blieb zur Kontrolle unbeimpft, eine andere wurde mit *B. extorquens*, zwei weitere Reihen mit *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* beimpft.

Das Resultat war auch hier das gleiche wie in den Blattkulturen: *B. extorquens* erweichte die Holundermarkwürfel und brachte die Calciumoxalatkristalle völlig zum Verschwinden. Die Zellen des Holundermarks fielen auseinander, jedoch ließ sich nicht mit Gewißheit feststellen, ob die Bakterien nur die Mittellamellen aufgelöst hatten oder auch, wie es den Anschein hatte, durch die Zellwände ins Innere gedrungen waren. Wohl fanden sich an dünnen Schnitten innerhalb der Zellen zahlreiche Bakterien; diese hätten

aber auch beim Schneiden der Würfel mechanisch hineingebracht sein können, da sie den Zellwänden in großer Menge äußerlich anhafteten.

Die beiden Schimmelpilze erweichten das Holundermark vollständig und färbten es schmutzig gelb. Eine Abnahme der Calciumoxalatkristalle hatte aber nicht stattgefunden.

In den sterilen Kölbchen war dagegen weder eine Veränderung der Holundermarkwürfel noch der Oxalatkristalle zu erkennen.

3. Quantitative Bestimmung der Calciumoxalatzersetzung.

Für diese Versuche kam eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung zur Anwendung:

1000 dest. Wasser,
1,0 g Monokaliumphosphat,
1,0 g Ammoniumsulfat,
0,2 g Magnesiumsulfat,
Spur Ferrichlorid.

Von dieser Minerallösung wurden je 50 ccm in Erlenmeyerkolben von Jenaer Glas abpipettiert, mit abgewogenen Mengen Calciumoxalat beschickt und sterilisiert. Hierauf beimpfte ich sieben dieser Kolben mit *B. extorquens*, und zwar sechs Kolben mit einer Reinkultur, den siebenten mit einer Rohkultur. Ferner wurde ein Kolben mit der Reinkultur eines im Boden ziemlich häufigen, schlanken mittelgroßen, lebhaft beweglichen und nicht sporenbildenden Stäbchens beimpft, das ich nicht identifizieren konnte und das, wie S. 266 erwähnt wurde, Oxalatlösungen trübte[1]). Ein weiterer Kolben wurde mit der Reinkultur eines gleichfalls im Boden häufigen, sehr lebhaft beweglichen, kleinen und kurzen, nicht Sporen bildenden Stäbchens beimpft, das gleichfalls Oxalatlösungen trübte[2]). Außerdem ließ ich einen Kolben zur Kontrolle unbeimpft stehen. Alle kamen in einen dunklen Thermostaten von ca. 25 °.

Die Resultate dieses Versuches, der 78—148 Tage dauerte, sind in der Tabelle I zusammengestellt.

1) In meiner Sammlung und in der Tabelle als Nr. 46 bezeichnet.
2) Desgl. als Nr. 44.

Tabelle I.

Nr. der Kultur	Beimpft mit	Versuchsdauer Tage	CaC_2O_4 gegeben g	Darin $C_2O_4^{\cdot\cdot}$ g	$C_2O_4^{\cdot\cdot}$ wiedergefund. g	$C_2O_4^{\cdot\cdot}$-Verlust in g	in %
1	Rohkultur von *B. extorqu.*	142	0,8144	0,4909	0,1222	0,3687	77,2
2	Kontrolle	142	1,2344	0,7443	0,7451	—	—
3	Reinkultur von *B. extorqu.*	110	0,5330	0,3210	0,1439	0,1771	55,3
4	Desgl.	144	1,2072	0,7279	0,2099	0,5180	71,17
5	Desgl.	138	0,8466	0,5123	0,0468	0,4655	94,47
6	Desgl.	78	0,4125	0,2486	0,0842	0,1644	66,13
7	Reinkultur von *B.* Nr. 46	78	0,4434	0,2673	0,2327	0,0346	12,94
8	„ „ *B. extorqu.*	78	0,3596	0,2166	0,0494	0,1672	77,2
9	„ „ *B.* Nr. 44	148	0,5364	0,3223	0,3123	0,010	3,1
10	„ „ *B. extorqu.*	118	1,5713	0,9465	0,0845	0,8620	91,10

Zur Bestimmung des in den Kulturkolben noch vorhandenen Oxalats wurde beim Abbruch der Versuche die Nährlösung vom unlöslichen Rückstand abfiltriert, der Rückstand in 2-norm. Schwefelsäure gelöst, wobei in den Kulturen des *B. extorquens* stets eine starke Gasentwicklung zu beobachten war; hierauf filtrierte ich die Lösung zur Entfernung der Bakterien durch eine Porzellankerze, wusch gründlich mit verdünnter Schwefelsäure nach, erwärmte auf ca. 60° und titrierte mit 0,1 norm. Kaliumpermanganatlösung.

Im Niederschlag des Kulturkolbens Nr. 4 wurde außerdem die Menge der an das Calcium gebundenen Kohlensäure bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde der abfiltrierte Niederschlag getrocknet und in einen Kolben gegeben, der mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossen war und durch eine Glasröhre mit einer Absorptionsröhre in Verbindung stand, welche titrierte Barytlauge enthielt. Hierauf wurde durch ein Trichteransatzrohr verdünnte Schwefelsäure zugegeben und mittels eines dritten Glasrohrs, das durch den Gummistopfen bis an den Boden des Kolbens reichte, kohlensäurefreie Luft zur Verdrängung des durch die Schwefelsäure entbundenen Kohlendioxyds durchgeleitet. Nach Ablauf der unter Erwärmen eingeleiteten Reaktion und weiterem Durchleiten von kohlensäurefreier Luft wurde der Kolbeninhalt noch zur Bestimmung des Oxalations verwendet, während die Barytlauge mit Salzsäure und Phenolphthalein als Indikator titriert wurde. Die hierbei gefundene Kohlendioxydmenge betrug 0,3688 g. Diese Menge ent-

spricht 0,8382 g $CaCO_3$, darin also 0,3353 g Ca. Da in dem betreffenden Kolben 71,17 % von den ursprünglich vorhandenen 1,2072 g CaC_2O_4 zersetzt wurden, war 0,342 g Ca nicht an Oxalsäure gebunden, welcher Wert fast genau dem an Kohlensäure gebundenen, bei der Analyse gefundenen Calcium entspricht.

Das Calciumoxalat wird sonach von dem *B. extorquens* in Calciumkarbonat umgewandelt.

Da der Bazillus, wie wir weiter unten sehen werden, keinerlei durch Kochen unzerstörbare, das Calciumoxalat lösende Stoffe produziert, ist die Lösung des sehr schwer löslichen Calciumoxalats in den oben erwähnten Kulturen nur unter Zuhilfenahme des Massenwirkungsgesetzes zu verstehen. Die Löslichkeit dieses Salzes ist in Wasser bei der im Versuch herrschenden Temperatur von 25° allerdings sehr gering. Nach Th. W. Richards (1901, S. 83) werden in 100 ccm Wasser bei 25° nur 0,68 mg Calciumoxalat gelöst; in unseren Kulturen wäre, da sie nur 50 ccm Lösung enthielten, nur ungefähr $^1/_3$ mg dieses Salzes gelöst gewesen. Es war sonach noch festzustellen, ob sich der Bazillus auf derart geringen Konzentrationen leichtlöslicher Oxalate zu entwickeln vermag. Tatsächlich entwickelte er sich noch merklich in einer Kultur, die im Liter ca. 10 mg Ammonoxalat enthielt.

In den Calciumoxalatkulturen wird auch die von Richards wie auch von Kohlrausch (1905, S. 355) gefundene Konzentration des gelösten Calciumoxalats nie unter diese Konzentration gesunken sein, da die Bakterien, die das Oxalatpulver sehr fest umhüllten, die sukzessive in Lösung gehenden Mengen sofort verarbeiteten. Die Umhüllung des Calciumoxalatpulvers war so stark, daß sich dieses schon wenige Tage nach der Beimpfung nicht aufschütteln ließ, sondern durch die Bakterien verklebt, fest am Boden der Versuchsgefäße haftete.

Entsprechend seiner geringen Löslichkeit wurde daher das Calciumoxalat auch nur sehr langsam zersetzt, wie Tab. I zeigt.

Interessant ist die Tatsache, daß die beiden, in der Tabelle als Nr. 44 und 46 bezeichneten Bakterien, die auf Lösungen leichtlöslicher Oxalate, wie schon früher bemerkt, nur sehr schwache Trübungen erzeugten, merkliche, und, wie Bazillus Nr. 46, sogar ziemlich ansehnliche Mengen des Calciumoxalats zu zersetzen vermochten. A priori sollte man denken, daß gerade schwerlösliche Oxalate schwieriger zu zersetzen wären als leichtlösliche.

Das verschiedene Verhalten der letztgenannten Bakterien in Kulturen mit schwer- und leichtlöslichen Oxalaten läßt die Vermutung aufkommen, daß möglicherweise noch andere Bakterien, wenn auch im schwächeren Grade, an der Zersetzung des Calciumoxalats im Boden beteiligt sind.

4. Prüfung auf eventuelle Ausscheidung von Substanzen, welche schwerlösliche Oxalate lösen.

Diese Versuche führte ich aus, um auf eine möglichst einfache und augenfällige Art festzustellen, ob etwa *B. extorquens* besondere, das Calciumoxalat lösende Stoffe ausscheide.

Es wurden ausgewählte Stücke von Zwiebelschalen, die besonders viele und schön ausgebildete Calciumoxalatkristalle enthielten, in Kölbchen mit Winogradskischer Minerallösung sterilisiert und darauf unter peinlichster Wahrung aseptischer Kautelen auf sterile Deckgläser der schon früher erwähnten Glaskästchen gebracht. Die Zwiebelschalenstücke wurden unter folgende Bedingungen gebracht:

1. in sterile Winogradskische Minerallösung als Kontrollen;
2. in gleiche Lösung, doch beimpft mit einer Reinkultur des *B. extorquens;*
3. in ein aufgekochtes Filtrat einer Reinkultur des *B. extorquens* in Oxalatlösung, das durch eine Chamberland-Kerze filtriert worden war;
4. in dasselbe, jedoch unaufgekochte Filtrat.

Die Versuche wurden doppelt ausgeführt.

In allen vier Fällen büßten die Kristalle durch die Sterilisation bei 100° an Glanz und Glätte ihrer Flächen etwas ein. Während der nun folgenden einmonatlichen mikroskopischen Beobachtung wiesen die Kristalle im ersten und im dritten Falle keine weitere Veränderung auf. Im zweiten Fall *(B. extorquens)* waren nach sieben Tagen auch die letzten Kristalle verschwunden.

Im vierten Fall (unaufgekochtes Kulturfiltrat) büßten die Kristalle merklich an Glanz und Glätte ein, manche erschienen zerklüftet und zerfallen. Ob, wie mir schien, eine Abnahme derselben eingetreten ist, wage ich nicht zu behaupten, da ich leider beim Ansetzen des Versuches unterlassen habe, die Kristalle zu zählen.

Jedenfalls beweist dieser Versuch, daß durch den *B. extorquens* keinerlei durch Kochen unzerstörbare, das Calciumoxalat lösende Stoffe ausgeschieden werden.

Auf die Wirkung unaufgekochter Filtrate von Oxalatkulturen des *B. extorquens* auf lösliche Oxalate werde ich später zurückkommen.

V. Über Zersetzungsprodukte bei der Oxalatverarbeitung.

1. Nebenprodukte bei der Oxalatverarbeitung.

Die für diese Versuche zur Verwendung gelangte Nährlösung enthielt in 1000 ccm dest. Wasser:

2,5 g Ammonoxalat,
1,0 g Dikaliumphosphat,
0,2 g Magnesiumsulfat,
Spur Ferrichlorid.

Zwei 2-l-Kolben wurden mit je 1000 ccm dieser Nährlösung beschickt, mit einer Vorrichtung zum Durchsaugen von Luft versehen, sterilisiert und mit einer Reinkultur des *B. extorquens* beimpft; während der ganzen Versuchsdauer verblieben sie bei Zimmertemperatur. Täglich wurde während ca. 15 Minuten ein Luftstrom durch sie gesogen, der vorher eine Vorlage mit Schwefelsäure, dann eine zweite mit Kalilauge und zuletzt eine solche mit sterilisierter Watte passiert hatte. Beim Heraustreten aus dem Versuchsgefäß passierte der Luftstrom noch eine Kalilaugewaschflasche. Da die Reaktion infolge des Verbrauchs der Oxalsäure fortgesetzt stark alkalisch wurde, neutralisierte ich fast täglich mit einer Oxalsäurelösung von bekanntem Gehalt, wobei natürlich die Volumina der zugesetzten Oxalsäure notiert wurden.

Die folgende Tabelle II gibt Aufschluß über den Verbrauch an Oxalsäure.

Tabelle II.

Kulturkolben	Versuchsdauer	Oxalsäure				Trockensubstanz der Bakterien
		Gegeben	Nach Abbruch des Versuchs noch unzersetzt	Verarbeitet	Verarbeitet	
	Tage	g	g	g	in %	g
1	142	18,46	0,3418	18,1142	98,24	0,5698
2	80	8,27	0,2914	7,9786	96,35	0,4130

Die Nährlösung dieser Kulturen wurde zwecks Bestimmung der Trockensubstanz der Bakterien durch dichte Schleichersche Filter, hierauf nochmals zur vollständigen Befreiung von den Bakterien durch Porzellankerzen filtriert. Dann wurde die Nährlösung jedes Kolbens in zwei Portionen geteilt. Die eine säuerte ich mit verdünnter Schwefelsäure an und unterwarf sie zur Trennung etwa vorhandener flüchtiger Fettsäuren der fraktionierten Destillation. Die Destillate ergaben jedoch keine Reaktion auf die genannten Säuren, ebensowenig auf Aldehyde oder Alkohole.

In aliquoten Teilen der verbliebenen Portionen der Kulturflüssigkeit beider Kolben wurde zur quantitativen Bestimmung der noch unzersetzten Oxalsäure diese bei Anwesenheit von Ammoniak als Calciumsalz gefällt und mit Kaliumpermanganat titriert.

Die Restportionen der Kulturfiltrate wurden nach sehr vorsichtiger Ausfällung des ursprünglich in der Nährlösung vorhandenen Sulfats als Baryumsulfat auf fixe organische Säuren geprüft, und zwar: der Inhalt des einen Kolbens nach Fresenius, der des anderen unter Anwendung der von Berg und Gerber (1896, S. 1053 ff.) angegebenen Modifikation. Es konnten jedoch, abgesehen von Oxalsäure, keine anderen organischen Säuren nachgewiesen werden.

Auch in der Kalilaugewaschflasche, welche der den Versuchskolben verlassende Luftstrom passierte, konnte außer Kohlensäure keine andere (flüchtige) Säure entdeckt werden.

Es ist bekannt, wie heikel die Analyse auf organische Säuren ist. Ich habe darum mit besonderer Sorgfalt gearbeitet, doch bekam ich, mit Ausnahme der Oxalsäure, nie die geringste Andeutung für die Anwesenheit irgend einer anderen Säure. Auch die Suche nach Aldehyden und Aldehydsäuren, denen ich besondere Aufmerksamkeit widmete, blieb nicht nur in den soeben besprochenen, sondern auch in den Filtraten zahlreicher anderer Kulturen ergebnislos.

Bacillus extorquens bildet sonach bei der Verarbeitung der Oxalsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle außer Kohlendioxyd keinerlei faßbare Neben- oder Zwischenprodukte.

2. Gasförmige Produkte bei der Oxalatverarbeitung.

Für einen Vorversuch kamen Gärkölbchen zur Verwendung, die mit Nährlösung von der gleichen Zusammensetzung wie im vor-

hergehenden Versuch gefüllt, hierauf pasteurisiert, mit *B. extorquens* beimpft und in den dunklen Thermostaten von 25° gestellt wurden.

Infolge des behinderten Sauerstoffzutritts erfolgte das Wachstum des Bazillus in den Gärkölbchen, und besonders in den aufsteigenden Schenkeln, nur langsam. Nachdem sich aber nach mindestens zwei Wochen und nach mehrmaligem Zusetzen von Oxalsäure oben im geschlossenen Schenkel eine erbsengroße bis höchstens ca. 1 ccm große Gasblase gebildet hat, wurde 40proz. Kalilauge zugesetzt und umgeschüttelt. Das Gas wurde durch die Kalilauge völlig absorbiert, woraus zu folgern war, daß es nur aus Kohlendioxyd bestand.

Da aber die Gärkölbchenversuche in diesem Falle eine lange Versuchsdauer, sehr vorsichtiges, aber reichliches Zusetzen von Oxalsäure verlangen und trotzdem oft nur eine winzige Gasblase ergeben, wurde ein Versuch mit einer 2 l fassenden Kulturflasche mit abgesperrtem Luftvolum ausgeführt.

Die Kulturflasche erhielt genau 1000 ccm Minerallösung + 5 g oxalsaures Ammon. Nach der Sterilisierung wurde die Flasche mit einem frischen durchbohrten Gummistopfen, über den noch eine dicke Schicht von hochschmelzbarem Paraffin gegossen wurde, verschlossen und dann 7 Stunden lang ein kohlensäurefreier Luftstrom hindurchgeleitet. Hierauf impfte ich die Nährlösung durch Abbrechen eines den Gummistopfen passierenden, unten ausgezogenen, zugeschmolzenen Glasröhrchens, das eine Aufschwemmung einer Reinkultur des *B. extorquens* enthielt, und schloß hierauf das Röhrchen wieder mit Gummischlauch und Glasverschluß. Die Kulturflasche kam nun in einen mit Wasser gefüllten Behälter, dessen Temperatur während der ganzen Kulturdauer auf 27—28° erhalten wurde.

Nachdem sich nach fünf Tagen in der Kulturflüssigkeit eine kräftige Bakterienhaut entwickelt hatte, wurde der Kulturflasche durch Ansetzen einer Gasbürette zweimal je 100 ccm Gas entnommen, in eine mit ammoniakalischem Cuprochlorid beschickte Absorptionspipette geleitet und geschüttelt. Dabei fand jedoch keine Abnahme des ursprünglichen Gasvolums statt. Hierauf wurde das Gas nach C. Winkler mehrmals über Palladiumasbest geleitet, wobei schließlich die Kapillare noch stärker erhitzt wurde. Aber auch diese Operation führte zu keiner Volumverminderung des aufgefangenen Gases.

Hieraus folgt, daß *B. extorquens* bei der Verarbeitung der Oxalsäure weder Kohlenoxyd, noch Wasserstoff oder schließ-

lich Methan, die sich bei der angewandten Analysenart bestimmen ließen, produziert.

Die quantitativen Verhältnisse der Kohlendioxydbildung bei der Oxalatverarbeitung durch *B. extorquens* werden im nächsten Abschnitt behandelt werden.

3. Kohlenstoffbilanz bei der Oxalatverarbeitung.

Die nachstehenden Versuche hatten den Zweck, die Mengen der Oxalsäure festzustellen, die einerseits zum Aufbau der Leibessubstanz verwendet, andererseits veratmet und als Kohlendioxyd ausgeschieden werden. Aus den gewonnenen Daten läßt sich übrigens nicht nur die Kohlenstoffbilanz, sondern auch die Atmungsintensität des Bazillus berechnen.

Der für diesen Versuch verwendete Apparat war demjenigen ähnlich, dessen sich W. P. Wilson (Pfeffer, 1881/82, S. 636) bei seinen Studien über die intramolekulare Atmung bediente.

Der den Apparat passierende Luftstrom wurde durch eine 60 l fassende Saugflasche erzeugt. Ehe der Luftstrom in das Kulturgefäß gelangte, passierte er eine starke Vorlage mit 40 % Kalilauge, hierauf eine zweite Vorlage mit konz. Schwefelsäure, dann noch eine Baryumhydroxyd-Vorlage. Von hier aus gelangte die Luft durch eine Glasröhre bis auf den Boden der 2 l fassenden Kulturflasche, die mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossen war. Aus der Kulturflüssigkeit gelangte die Luft durch ein anderes Glasrohr, das sich in zwei mit Glashähnen versehene Arme teilte, in die Pettenkoferschen Absorptionsröhren, die mit titrierter Baryumhydroxydlösung gefüllt waren. Aus diesen kam der Luftstrom durch eine weitere zweiarmige, mit Hähnen versehene Glasröhre in eine letzte Barytwaschflasche, um hier von etwaigen noch mitgerissenen Resten von Kohlendioxyd vollends befreit zu werden und von hier in die große Saugflasche. Die Berührungsstellen der verschiedenen Glasröhren wurden, wo es nur irgendwie möglich war, durch Gummischlauch derart verbunden, daß Glasrohr an Glasrohr stieß. Die Dichtigkeit des Apparates war vollständig.

Die Kulturflasche mit 1000 ccm Nährlösung von der schon mehrfach erwähnten Zusammensetzung, die also 2,5 g oxalsaures Ammon enthielt (als einzige Kohlen- und Stickstoffquelle), wurde nach Infektion mit einer sechs Tage alten Bakterienhaut des *B. extorquens* in ein mit Wasser von 26° gefülltes Zinkgefäß eingesenkt und verblieb darin bei dieser Temperatur während der

ganzen Kulturdauer. In dieser Zurüstung schaltete ich die Kulturflasche in den Apparat ein und ließ dann die Luft im langsamen Tempo von durchschnittlich 2,6 l pro Stunde durchgehen. Die Pettenkoferschen Röhren konnten dabei ohne Unterbrechung des Versuches umgewechselt resp. umgeschaltet werden. Im Laufe des Versuches wurden durch ein mit Glashahn versehenes, den Gummistopfen der Kulturflasche passierendes Trichterrohr 0,75 g wässerige Oxalsäure in kleineren Portionen der Nährlösung zugesetzt.

Die Resultate dieses Versuches sind in Tabelle III angegeben.

Tabelle III.

Nr. der Absorptionsröhren	Versuchsdauer Stdn.	Durchgesog. Luft l	Produzierte CO_2 g	Trockengewicht d. Bakter. g	Oxalsäure-Bilanz g
					Gegeben 2,1202 (in 2,5 g $(NH_4)_2C_2O_4 + H_2O$ und in 0,75 g $H_2C_2O_4 + 2\,H_2O$)
I	84	198	0,1687		
II	8	50	0,1769		
III	16	30	0,2670		Wiedergefunden 0,7267
Summa	108	278	0,6126	0,3993	Verbraucht 1,3935

Die zur Verwendung gelangte Barytlauge war 0,5 norm. vom Index 0,625. Sie wurde mit 0,5 norm. Salzsäure und Phenolphthalein als Indikator titriert.

Da aber in dem eben erwähnten Versuch die genaue Menge der gebildeten Trockensubstanz der Bakterien infolge der Impfung mit einer schon angewachsenen Bakterienhaut nicht bestimmt werden konnte, führte ich einen analogen Versuch aus, bei dem ich die Nährlösung mit einer Spur einer Gelatinereinkultur impfte. Außerdem leitete ich vor der Beimpfung einen Strom kohlendioxydfreier Luft während mehrerer Stunden durch die Nährlösung, um etwa vorhandenes Kohlendioxyd auszutreiben.

Die Temperatur schwankte in diesem Versuch zwischen 28,5° und 29°.

Die Bestimmung des unverbrauchten Oxalatrestes erfolgte nach Abfiltrieren der Bakterien durch dichte Schleichersche Filter und nach vollständiger Klärung der Kulturflüssigkeit durch Filtration durch eine Chamberland-Kerze mittels Fällung mit Calciumchlorid. Das entstandene Calciumoxalat wurde dann abfiltriert, ausgewaschen

und in 2 norm. Schwefelsäure gelöst und mittels Kaliumpermanganat in der Wärme titriert.

Was die Bestimmung der Bakterientrockensubstanz anbetrifft, so ließen sich die Bakterien, da sie in Flüssigkeiten in zusammenhängenden zähen Häuten wachsen, leicht filtrieren; getrocknet wurden sie bei 120° in gewogenen dichten Schleicherschen Filtern.

Die Dauer des Versuches betrug im ganzen 9 Tage, die Anzahl der verwendeten Absorptionsröhren war 18. Die hinter den Absorptionsröhren eingeschaltete Baryumhydroxydlösung blieb klar, alles Kohlendioxyd war also schon in den Pettenkoferschen Röhren absorbiert worden. Nach Abbruch des Versuches wurde der Kulturflüssigkeit verdünnte Schwefelsäure zugesetzt, um die Bakterien abzutöten. Hierauf trieb ich einige Stunden lang nochmals einen kohlendioxydfreien Luftstrom durch die Nährlösung, um alles in der Kulturflüssigkeit noch gelöste Kohlendioxyd zur Absorption zu bringen.

Die Resultate dieses Versuches sind in Tabelle IV enthalten.

Tabelle IV.

Versuchsdauer	Durchgesog. Luft	CO_2 gebildet	Bakterien trocken	Oxalsäure (wasserfrei)		
				Gegeben	Gefunden	Verbrauch
Stdn.	l	g	g	g	g	g
224¾	942	3,5632	0,4583	5,1233	0,5937	4,5296

Die nun folgende Kohlenstoff- und Energiebilanz beruht auf den Daten des obigen Versuches.

Kohlenstoff- und Energie-Bilanz.

Die Kulturflüssigkeit enthielt zu Beginn des Versuches 2,5 g $(NH_4)_2C_2O_4 + H_2O$ = . . .	1,5875 g	$H_2C_2O_4$ =	0,4232 g C
Zur Neutralisation der Nährlösung während des Versuches Oxalsäure zugesetzt in einzelnen Dosen von 0,3—0,5 g, im ganzen 4,95 g = wasserfrei .	3,5358 g	„ =	0,9426 g C
Zusammen	5,1233 g	„ =	1,3658 g C
Davon wiedergefunden nach Abschluß des Versuches . . .	0,5937 g	„ =	0,1483 g C
Demnach verarbeitet	4,5296 g	$H_2C_2O_4$ =	1,2175 g C

Übertrag	4,5296 g $H_2C_2O_4$ = 1,2175 g C	
Im Laufe des Versuches sind ausgeschied. worden 3,5632 g CO_2	= 0,9717 g C	
Ferner sind gebildet an Bakterientrockensubstanz 0,4583 g, wovon ich 50 % C annehme	= 0,2291 g C	
Zusammen	1,2008 g C	1,2008 g C
Es ergibt sich sonach ein Verlust von		0,0167 g C

Energie-Bilanz.

Nun beträgt die Verbrennungswärme der Oxalsäure pro 1 g nach Stohmann (1890, S. 345) 678,6 kal., für 4,5296 g verbrauchter Oxalsäure sonach 4,53 · 6,78	3071 kal.
Die Verbrennungswärme der gebildeten Bakterientrockensubstanz, unter Zugrundelegung der Angaben Nenckis, 5000 kal. pro 1 g Bakt., beträgt daher 0,458 · 5000	2291 kal.

Dieses Resultat stimmt also mit demjenigen der Kohlenstoffbilanz überein und beweist, daß die zersetzte Oxalatmenge ausreichte, um den Energiebedarf der Bakterien zu decken.

Endlich ist auch die Atmungsintensität des *B. extorquens* aus den ermittelten Daten leicht zu berechnen; die Ausscheidung von Kohlendioxyd pro 1 g Trockensubstanz des *B. extorquens* betrug in diesem Versuch in 24 Stunden bei 29° 1,68 g. Hierbei mag noch bemerkt werden, daß sie in einem anderen, nur zwei Tage dauernden Versuch bedeutend höher war, und zwar 2,5 g pro 1 g Trockensubstanz betrug.

4. Sauerstoffverbrauch bei der Oxalatverarbeitung.

Um einen weiteren Einblick in den Prozeß der Oxalsäureverarbeitung durch den *B. extorquens* zu gewinnen, war es von Interesse, auch den Sauerstoffkonsum kennen zu lernen. Hierbei mußte natürlich mit Kulturgefäßen operiert werden, deren Luftvolum von der Außenluft abgesperrt blieb.

Als Versuchsgefäß diente eine 2-l-Flasche, die derart mit der schon öfters erwähnten Nährlösung beschickt wurde, daß das darüber befindliche Gasvolum genau 1 l betrug. Die Temperatur lag während des Versuches bei 29°. Nachdem durch mehrstündiges Durchleiten eines kohlendioxydfreien Luftstroms die Nährlösung bei der

angegebenen Temperatur mit Luft gesättigt worden war, wurde mit einer Spur einer Reinkultur des *B. extorquens* beimpft und das Kulturgefäß mit genau 1000 ccm kohlendioxydfreier Luft unter Vermeidung von Überdruck aus einem Gasometer gefüllt, abgesperrt und sich selbst überlassen. Täglich wurden nun zweimal je 100 ccm Gas, das erst eine mit titrierter Barytlauge beschickte Pettenkofersche Absorptionsröhre passierte, direkt in die Gasbürette gesogen, der Sauerstoff durch Absorption in einer Pyrogallolpipette bestimmt und auf das ganze Gasvolum der Kulturflasche umgerechnet. Hierauf wurde der verbliebene Gasrest im Kulturgefäß durch kohlendioxydfreie Luft verdrängt, sodann ohne Überdruck auf genau 1000 ccm aufgefüllt und abgesperrt. Diese Operationen wurden während der ganzen Versuchsdauer täglich wiederholt.

Es muß bemerkt werden, daß die Bakterien unter diesen Bedingungen sich langsamer entwickelten als in einer ständig durchlüfteten oder nur mit Watteverschluß versehenen Kultur. Durch die starke Ansammlung von Kohlensäure in der Nährlösung werden die Bakterien geschädigt (asphyktisch); wenn die Schädigungen durch die eigene Atmungskohlensäure auch nicht so stark sind wie etwa diejenigen, die Frankland und auch Fraenkel bei Kultur in einer Kohlendioxyd-Atmosphäre beobachtet haben, so sind sie doch sehr störend.

Im ganzen habe ich vier der oben beschriebenen Versuche ausgeführt. Da ihre Resultate sehr gut miteinander übereinstimmten, führe ich nur die Resultate des letzten derselben an (Tabelle V).

Tabelle V.

Versuchsdauer	Oxalsäure (wasserfrei)			Gebildetes Kohlendioxyd	Verbrauchter Sauerstoff
	Gegeben	unzersetzt gefunden	Verbrauch		
Stdn.	g	g	g	g	g
116	3,059	1,303	1,756	0,6918	0,3012

Es wurden demnach auf 1 g verbrauchter Oxalsäure 0,1715 g Sauerstoff verbraucht (0,3912 : 1,756), welcher Wert insofern überrascht, als er dem für die Oxydation der Oxalsäure durch Kaliumpermanganat berechneten Werte sehr nahe kommt, wo bekanntlich 1 g-Mol Oxalsäure zu ihrer Oxydation 1 g-Atom Sauerstoff bedarf, also auf 1 g Oxalsäure 0,1777 g Sauerstoff.

Sonach verläuft die Spaltung der Oxalsäure durch *B. extorquens* nach der theoretischen Formel:

$$C_2O_4H_2 + O = 2\ CO_2 + H_2O.$$

Diese Formel gilt für die biologische Oxydation der Oxalsäure nur bezüglich ihres Sauerstoffverhältnisses, da ja nur ein Teil des Kohlendioxyds, das nach der angeführten Formel entstehen sollte, bei der Analyse wiederzufinden ist; der Rest wird offenbar zum Aufbau der Leibessubstanz der Bakterien verwendet.

VI. Enzymatische Natur der Oxalatspaltung.

Der nachstehende Versuch sollte eventuell die schon S. 266/7 berührte Frage nach der enzymatischen Natur der Oxydation der Oxalsäure beantworten.

Aus mehreren in dieser Richtung unternommenen Versuchen möchte ich hier vorläufig nur zwei aufführen; die weitere Bearbeitung dieser Frage behalte ich mir für später vor.

In eine 2 l fassende Flasche wurden 600 ccm der gewöhnlich verwendeten Nährlösung gegeben und sorgsam sterilisiert. Hierauf leitete ich mehrere Stunden lang einen kohlendioxydfreien Luftstrom durch die Nährlösung, brachte dann eine schon entwickelte, 3 Tage alte, dicke Haut des *B. extorquens* aus einer Flüssigkeitskultur mit Ammonoxalat hinein und setzte sofort unter starkem Umschütteln 2 % Toluol zu.

Am nächsten Tage wurde während $1^1/_2$ Stunden durch die bis dahin von der Außenluft abgesperrte Kulturflasche ein kohlendioxydfreier Luftstrom durchgeleitet, ebenso an den folgenden Tagen; nur dauerte dann die Durchlüftung länger. Aus der Kulturflüssigkeit gelangte der Luftstrom in eine Pettenkofersche Absorptionsröhre, die mit titrierter Baryumhydroxydlösung gefüllt war. Nach 76 Stunden wurde der Versuch abgebrochen, da die Kohlendioxydausscheidung schwächer wurde. Die noch unzersetzte Oxalsäure wurde, gerade wie ich das zu Beginn des Versuches und zwar noch vor dem Hineinbringen der Bakterienhäute getan hatte, auf die mehrfach erwähnte Art bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle VI angegeben.

Theoretisch hätten bei einer oxydativen Spaltung von 0,2862 g Oxalsäure 0,2798 g Kohlendioxyd entstehen sollen; immerhin kommt der im Versuch gefundene Wert (0,2882 g CO_2) dem berechneten sehr nahe.

Tabelle VI.

Versuchsdauer	Temperatur	Oxalsäure (wasserfrei)			Gebildetes Kohlendioxyd	Zersetzte Oxalsäure
		Gegeben	Wiedergefunden	Zersetzt		
Stdn.	° C	g	g	g	g	%
76	30	1,3122	1,0260	0,2862	0,2882	21,73

Daß die Oxydation in diesem Versuch mit Toluolzusatz enzymatischer Natur war, beweist der Umstand, daß in sechs die übliche Oxalatnährlösung enthaltenden Kölbchen, die ich mit Bakterienhautresten resp. einer geringen Menge der unter der Toluolschicht befindlichen Kulturflüssigkeit beimpft hatte, keinerlei Bakterienentwicklung eintrat. In den gleichzeitig mit einer Reinkultur beimpften Kontrollkölbchen hatte sich dagegen schon am nächsten Tage eine reichliche Bakterienhaut entwickelt. Es mag hier noch bemerkt werden, daß die bei Beginn des Toluolversuches neutrale Lösung eine stark alkalische Reaktion aufwies.

Ein für mich unerwartetes Ergebnis lieferte der nachstehende Versuch:

Eine auf der gewohnten Oxalatlösung recht gut gewachsene junge Kultur wurde unter peinlichster Wahrung der Asepsis durch ein sterilisiertes Chamberland-Filter filtriert und in eine sterilisierte Flasche gegeben. Das Filtrat war völlig klar und enthielt keine Keime, wie die damit vorgenommenen Impfungen von Oxalatlösungen bewiesen. In einem aliquoten Teil der filtrierten Flüssigkeit wurde dann das gelöste Kohlendioxyd und die noch vorhandene Oxalsäure auf die übliche Weise bestimmt.

Durch den Rest des Filtrates wurde nun $8^1/_2$ Stunden lang, während denen ein etwa vorhandenes Enzym die noch nicht verarbeitete Oxalsäure weiter spalten konnte, ein kohlendioxydfreier Luftstrom geleitet, der nach Verlassen des Versuchsgefäßes eine Pettenkofersche Absorptionsröhre mit titrierter Barytlauge passierte.

Die Resultate sind in der Tabelle VII niedergelegt.

Tabelle VII.

Versuchsdauer	Temperatur	Oxalsäure (wasserfrei)				Gebildetes Kohlendioxyd
		Gegeben	Wiedergefunden	Zersetzt	Zersetzt	
Stdn.	° C	g	g	g	%	g
$8^1/_2$	32	0,3440	0,2534	0,0906	26,34	0,0968

Da auch hier die gefundene Kohlendioxydmenge nur wenig von der berechneten abweicht, da ferner Infektionsversuche mit der Versuchsflüssigkeit nach Abbruch des Versuches auch jetzt, wie im Anfang, erfolglos blieben, Bakterien demnach nicht vorhanden waren, unterliegt es nunmehr keinem Zweifel, daß die oxydative Spaltung der Oxalsäure durch ein von *B. extorquens* abgeschiedenes Enzym, und zwar durch ein Ektoenzym hervorgerufen wird, da es sich schon in einem Porzellankerzenfiltrat vorfindet.

Da in den erwähnten Versuchen die Oxydation der Oxalsäure ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd vor sich geht, so scheint es sich um eine echte Oxydase zu handeln. Sie ist daher mit der von Batelli (1904) entdeckten und von Z. Sarafoff (1908) näher studierten Oxydase nicht identisch, die nur bei Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd Ameisensäure zu oxydieren vermag und in verschiedenen tierischen Organen sich vorfindet. Überdies gibt Batelli selbst an, daß seine Oxydase Oxalsäure nicht anzugreifen vermag.

Was noch den direkten Nachweis einer Oxydase in *B. extorquens* anbetrifft, so habe ich diesen derart geführt, daß ich Bakterienhäute in frische Guajaklösung resp. in Guajakonsäurelösung brachte, wobei ich, ohne Wasserstoffperoxyd zuzusetzen, Bläuung erhielt.

In den oxydativen enzymatischen Prozeß der Oxalsäurespaltung greift aber der noch völlig dunkle Vorgang des Aufbaues der Leibessubstanz von *B. extorquens* ein, wie dies die Kohlenstoffbilanz (vgl. S. 282/3) zeigt, wo die entstandene Kohlendioxydmenge, im Gegensatz zu diesem Enzymversuch, durchaus nicht der zugesetzten Oxalsäuremenge entsprach. Ob nun der *B. extorquens* mit Hilfe der aus der Oxydation der Oxalsäure gewonnenen Energie die abgespaltene Kohlensäure reduziert, oder, ob schon ein Teil der Oxalsäure direkt, etwa zu Glyoxylsäure, reduziert wird, dies läßt sich auf Grund der bisher gewonnenen Resultate nicht entscheiden. Diese Frage wird noch im folgenden Abschnitt ausführlicher erörtert werden.

Im Zusammenhang mit dem vorhin besprochenen oxydierenden Enzym mag noch erwähnt werden, daß der Bazillus reichlich Katalase produziert, da Wasserstoffsuperoxyd, das seinen Kulturen zugesetzt wird, eine geradezu stürmische Zersetzung erfährt.

VII. Nährstoffe des *Bacillus extorquens*.

1. Kultur des *B. extorquens* auf verschiedenen Kohlenstoffverbindungen.

Um die Wirkung anderer Kohlenstoffverbindungen mit derjenigen der Oxalsäure zu vergleichen, und vor allem, um einen tieferen Einblick in die Ernährungsbedingungen des *B. extorquens* zu gewinnen, wurde er auf den in Tabelle VIII aufgeführten Stoffen kultiviert. Als Stickstoffquelle diente, mit einigen Ausnahmen, in denen der betreffende Stoff zugleich Kohlenstoff- und Stickstoffquelle war, stets Ammon. Im übrigen gebrauchte ich die gewohnte Minerallösung.

Das Maß der Bakterienentwicklung wurde in der Tabelle durch Kreuzchen bezeichnet, wobei drei Kreuze das beste Wachstum bedeuten. Wenn auch diese Art der Bezeichnung der Wachstumsgröße wenig exakt ist, und allein Trockengewichtsbestimmungen zu dem erstrebten Ziele führen würden, erhielt ich auf diesem Wege wenigstens Vergleichswerte, welche annähernde Schlüsse auf den größeren oder geringeren Nährwert der untersuchten Substanzen zu ziehen erlauben.

Der vorliegende Versuch wurde in zwei Serien, deren jede wieder drei Parallelreihen umfaßte, zu verschiedenen Zeiten ausgeführt, um nach Möglichkeit Zufälligkeiten im Wachstum auszuschließen. Selbstverständlich wurden alle Versuchsgefäße jeder Serie unter gleichen äußeren Bedingungen der Temperatur und der Belichtung gehalten. Die Reaktion der Nährlösungen war überall neutral, mit Ausnahme einiger weniger Fälle, wie z. B. bei Asparagin, das schwach sauer reagierte, aber nicht neutralisiert wurde, um eventuelle Wachstumsunterschiede auf reinem Asparagin und einem asparaginsauren Salz feststellen zu können. Die Beobachtungsdauer der einen Serie betrug fünf Tage; da aber in so kurzer Zeit die Unterschiede in der Entwicklung der verschiedenen Kulturen noch schwach hervortreten, gebe ich in Tabelle VIII die Resultate der zweiten über einen Monat dauernden Serie wieder. Übrigens muß erwähnt werden, daß die Resultate beider Serien übereinstimmten, wenn sie auch wegen der ungleichen Kulturdauer nicht immer gleich scharf hervortraten.

Die Temperatur (Thermostat) betrug überall $\pm 25^{\circ}$.

Tabelle VIII.

Kohlenstoffquelle	Stickstoffquelle	Versuchsdauer Tage	Wachstum	Bemerkungen
Ameisensaures	NH_3	37	++(+)[1]	Wachstum langsam
Essigsaures	„	34	?	
Propionsaures	„	34	?	
n-Buttersaures	„	34	0	
Valeriansaures	„	34	?	
Glycolsaures	„	28	++	Sehr schnelles Wachstum
Milchsaures	„	37	++	Sehr langsames Wachstum
Oxalsaures	„	37	+++!	Schnelles Wachstum
Mesoxalsaures	„	30	+++!	Sehr schnelles Wachstum
Glyoxylsaures	„	30	+++!	Desgl.
Malonsaures	„	37	+++	Langsames Wachstum
Bernsteinsaures	„	37	+++!	Schnelles Wachstum
Glutarsaures	„	37	+	Langs. u. schwach. Wachstum
Adipinsaures	„	37	+ (?)	
Sebacinsaures	„	37	+ (?)	
Suberinsaures	„	37	+ (?)	
Fumarsaures	„	37	+++!	Schnelles Wachstum
Maleinsaures	„	37	+++	Desgl.
Itaconsaures	„	37	(+)	Sehr schwaches Wachstum
Mesaconsaures	„	37	(+)	Desgl.
Tartronsaures	„	37	+	
Äpfelsaures	„	37	+(+)	
Weinsaures	„	37	+	
Zitronensaures	„	37	+ (?)	
Stearinsaures	„	34	?	
Benzoesaures	„	30	++	
Salicylsaures Na	$(NH_4)_2SO_4$	30	++	
Chinasaures	NH_3	30	++	
Phenylessigsaures Ca	$(NH_4)_2SO_4$	30	+++	
Zimmtsaures Na	„	30	?	
Phtalsaures	NH_3	30	+(+)	
Mellitsaures	„	30	+ (?)	
Harnstoff	—	27	++(+)	Langsames Wachstum
Harnsäure	—	27	+(++)	Desgl.
Parabansäure	—	30	++	Ziemlich schnelles Wachstum
Oxalursäure	NH_3	30	++	Schnelles Wachstum
Oxaminsäure	„	30	+++!	Desgl.
Alloxan	—	30	++	Sehr schnelles Wachstum
Oxamid	—	30	+++!	Alles Oxamid gelöst
Formamid	—	30	++	Schnelles Wachstum
Acetamid	—	30	+(+)	Ziemlich langsames Wachstum
Glycocoll	—	30	++	

1) Die eingeklammerten Zeichen beziehen sich auf die Ergebnisse der I. Serie, wo diese von denjenigen der II. Serie abweichen.

Kohlenstoffquelle	Stickstoffquelle	Versuchsdauer Tage	Wachstum	Bemerkungen
Leucin	—	30	++	
Sarkosin	—	30	++	
Alanin	—	30	++	
Asparagin	—	30	+	
Asparagin - Na	—	30	++	
Benzamid	—	30	+ (+)	
Diphenylamin	starke Konzentr.	30	+	
Diphenylamin	schwache „	30	++	
Methylalkohol	$(NH_4)_2SO_4$	30	+++!	Schnelles Wachst., Säurebild.
Äthylalkohol	„	30	+++	Zieml. schnell. Wachst., „
Propylalkohol	„	30	++	Langsam. Wachst., Säurebild.
iso - Butylalkohol	„	30	+ (+)	Desgl.
Amylalkohol	„	30	+	Desgl.
Glycerin	„	30	+++!	Schnelles Wachstum
Erythrit	„	30	++	Ziemlich schnelles Wachstum
Adonit	„	30	+ (+)	Langsames Wachstum
Mannit	„	30	+++	Ziemlich langsam. Wachstum
Sorbit	„	30	+++!	Ziemlich schnelles Wachstum
Dulcit	„	30	++	Langsames Wachstum
Isodulcit	„	30	+ (+)	Desgl.
Benzylalkohol	„	30	?	
Formaldehyd	„	30	+++	Schnelles Wachstum
Acetaldehyd	„	30	+	Langsames Wachstum
Paraldehyd	„	30	++	Desgl.
Benzaldehyd	„	30	+	Desgl.
Nitrobenzaldehyd	„	30	?	
Nitrobenzaldehyd	—	30	+	Langsames Wachstum
Salicylaldehyd	$(NH_4)_2SO_4$	30	+ (?)	
Toluylaldehyd	„	30	+ (?)	
Anisaldehyd	„	30	+ (?)	
Zimtaldehyd	„	30	+ (+)	
Benzophenon	„	30	? (+)	
Acetophenon	„	30	?	
Dextrose	„	30	+++	Langsames Wachstum
Rohrzucker	„	30	+	Desgl.
Milchzucker	„	30	+	Desgl.
Maltose	„	30	++	Desgl.
Dextrin	„	30	+	Desgl.
Pepton	—	30	++	Desgl.
Phenol (0,025 %)	$(NH_4)_2SO_4$	30	+	Schnelles Wachstum
Phenol - Na (0,05 %)	„	30	++	Desgl.
Toluol	„	30	+	Desgl.
Verschiedene Alkaloide		30	0	

Aus dieser Aufzählung ist vor allem zu ersehen, daß die besten Nährquellen für *B. extorquens* die niederen Glieder der Oxalsäurereihe sind, also Oxalsäure, Malon- und Bernsteinsäure, ferner Abkömmlinge der Oxalsäure, wie Oxaminsäure und Oxamid, dann die Mesoxal- und Glyoxylsäure, schließlich der Formaldehyd, Methyl- und Athylalkohol; von mehrwertigen Alkoholen das Glyzerin und Sorbit, endlich Dextrose. Besonders auffallend ist das gute Wachstum auf Harnstoff und Alloxan und das Ausbleiben der Bakterienentwicklung auf den Fettsäuren von der Essigsäure an; außerdem das ziemlich gute Wachstum auf schwachen Phenollösungen. Was die einwertigen Alkohole anbetrifft, so werden diese ohne Zweifel zu Säuren oxydiert; die Nährlösungen wurden bei wiederholten Versuchen stets schwach sauer.

Was nun die Assimilation des in der Oxalsäure enthaltenen Kohlenstoffes durch den *B. extorquens* anbetrifft, so kommen drei Möglichkeiten in Betracht: 1. die Reduktion der Oxalsäure zu Glyoxylsäure, oder 2. die Spaltung in Ameisensäure und Kohlendioxyd, 3. die Reduktion der aus der Oxalsäure durch das Enzym gebildeten Kohlensäure. Nun ist aber außer Kohlendioxyd kein anderes Spaltungs- oder Reduktionsprodukt in den Kulturen nachgewiesen worden; sonach kann einzig das Wachstum des *B. extorquens* auf den genannten Stoffen als Wegweiser dienen. Am schwächsten begründet wäre in unserem Fall die Spaltung in Ameisensäure und Kohlendioxyd, da der *B. extorquens* auf den verschiedensten Konzentrationen der Ameisensäure resp. der Formiate viel schlechter wächst als auf Oxalsäure. Für die Annahme einer Reduktion der Oxalsäure zu Glyoxylsäure würde das sehr gute Wachstum und das sehr schnelle Einsetzen desselben auf Glyoxylsäure sprechen. Die Annahme einer Reduktion der Kohlensäure wurde durch Anwesenheit eines die Oxalsäure in Kohlendioxyd spaltenden Enzyms und in der prompten und gleichfalls sehr raschen Entwicklung des Bazillus auf Formaldehyd begründet. Jedoch hat die Verarbeitung des Formaldehyds, der in Konzentrationen bis 1 : 10000 vom Bazillus recht gut vertragen wird, eine völlig unerwartete Komplikation ergeben. Da ich für diese noch keine auf Versuchen fußende Erklärung geben kann, will ich sie noch nicht erörtern, möchte aber auf Grund meiner Erfahrung die Reduktion der Oxalsäure zu Glyoxylsäure als die wahrscheinlichste ansehen. In einer besonderen Versuchsserie habe ich nachgewiesen, daß weder Kohlendioxyd noch kohlensaure Salze

dem *B. extorquens* als Nährquelle dienen können. Dieses Resultat war insoweit vorauszusehen, als der Bazillus sich die hierfür benötigte Energie, etwa aus der Oxydation des Ammoniaks, nicht zu beschaffen vermag, da er Ammoniak nicht oxydiert. Ebensowenig vermag der Bazillus aus Kohlenoxyd und Wasserstoff seine Leibessubstanz aufzubauen.

Aus gewissen Wachstumserscheinungen des *B. extorquens* auf den in der Tabelle aufgezählten Stoffen, wie z. B. aus dem früheren oder späteren Eintreten des Wachstums u. dgl., wage ich keine Schlüsse zu ziehen, da die Gründe für diese Unterschiede nicht untersucht worden sind. Zweifellos sind es aber keine Zufälle, wenn solche Eigentümlichkeiten sich stets wiederholten, wie z. B. das sehr schnelle Einsetzen des Wachstums auf Glycolsäure und das sehr langsame Wachstum auf der nah verwandten Milchsäure.

Was schließlich noch die Konzentration der in der Tabelle aufgeführten Stoffe anbetrifft, so betrug diese für die Säuren und die anderen löslichen „nichtgiftigen" Stoffe in einer Serie 0,25%, in der anderen 0,5 %. Giftige Stoffe, wie z. B. Phenol und Toluol wurden in Konzentrationen von 0,05 % gegeben; Alkohole in 2%-Lösungen, während Stoffe von besonderem Interesse, die in zahlreichen Kulturen verwendet wurden, in sehr variierenden Konzentrationen gegeben wurden.

2. Günstigste Oxalatkonzentration.

In einer Versuchsreihe wurde festgestellt, daß bei gleicher Zusammensetzung der mineralischen Nährlösung und gleicher Temperatur die drei löslichen oxalsauren Salze, das Na-, K- und das NH_4-Salz auf die Entwicklung des *B. extorquens* ungefähr die gleiche Wirkung haben. Allerdings tritt das Wachstum des Bazillus auf Ammonoxalat schneller ein als auf den anderen beiden Salzen. Auf der freien Säure erfolgt auch bei geringen Konzentrationen kein Wachstum. Über die Entwicklung auf den schwerlöslichen Salzen des Magnesiums, Baryums und Calciums wurde schon früher gesprochen; sie erfolgt auf diesen Salzen, wohl infolge der geringen Konzentration des löslichen Anteils, schneller als auf Natrium- und Kaliumsalzen. Im übrigen werden diese Salze entsprechend ihrer Löslichkeit verarbeitet, d. h. das Magnesiumsalz am schnellsten, das Calciumsalz am langsamsten. Von den drei löslichen Salzen der Oxalsäure wurden vergleichende Kulturen

mit Konzentrationen von 0,0005—5 % (5 mg bis 50 g im Liter) ausgeführt. Das Wachstum erfolgte in keinem Falle bei einer 2 % übersteigenden Konzentration des Oxalats. Schon bei 1 % des Oxalats war das Wachstum merklich behindert. Möglicherweise machen sich bei diesen Konzentrationen schon Giftwirkungen bemerkbar. Bei allen drei Salzen erwies sich ungefähr eine Lösung von 0,1—0,3 % am günstigsten. Dies ist immerhin nur so zu verstehen, daß auf den geringsten Konzentrationen das Wachstum zwar sehr schnell einsetzt, aber naturgemäß, sofern man nicht stets wieder das verarbeitete Oxalat ersetzt, bald zum Stillstand kommt.

Im allgemeinen entspricht aber die Oxalatkonzentration, welche vom Bazillus noch gut vertragen wird, der Konzentration des bei der Oxydation entstehenden Karbonats, die den Bazillus noch nicht schädigt. Durch die Verarbeitung des Oxalat-Ions wird nämlich soviel Karbonat gebildet, daß schließlich die Bakterien ihr Wachstum einstellen, selbst wenn das Oxalat zwar in sehr geringen Konzentrationen, aber während einer längeren Periode immer wieder erneuert wird. So z. B. erreicht man in einer 0,1 proz. Oxalatlösung nach einigen Tagen keine Fällung mehr mit Calciumacetat, da alles Oxalat verarbeitet ist; dagegen erhält man in einer Kultur mit 1 proz. Oxalsäure, die man in der Zwischenzeit nicht mit Oxalsäure neutralisiert hat, mit Calciumacetat noch nach zehn Wochen ziemlich reichliche Niederschläge von Calciumoxalat. Die Bakterien vermögen, offenbar geschädigt durch die starke Alkaleszenz infolge von Karbonatbildung, das Oxalat nicht völlig zu verarbeiten.

Aus diesen Gründen muß der Begriff einer „optimalen Nährstoffkonzentration“ relativ bleiben, was natürlich auch für die nächsten Versuche zutrifft, welche die Ernährung des *B. extorquens* mit Stickstoffquellen behandeln.

3. Stickstoffquellen und deren optimale Konzentration.

Der *Bacillus extorquens* vermag seinen Stickstoffbedarf mit anorganischen Stickstoffverbindungen zu decken, was ja auf Grund seines Verhaltens einer so einfachen Kohlenstoffverbindung, wie es die Oxalsäure ist, zu erwarten war.

Aus den Amiden, deren einige in der Tabelle VIII aufgeführt sind, kann er sowohl seinen Kohlenstoff- wie auch seinen Stickstoffbedarf decken, wenn auch das Wachstum auf Amiden nie dieselbe Schnelligkeit und Intensität erreicht, wie auf Oxalat und Ammon-

salzen. Oxalatkulturen mit Amiden (Formamid, Acetamid und Asparagin) ergaben nie ein besseres Wachstum, als wenn dem Oxalat nur Ammonsalze zugesetzt wurden. Jedoch vermag sich der Bazillus nach längerer Kultur und oftmaliger Überimpfung an viele Nährquellen anzupassen, auf denen er anfänglich nur ein schlechtes Wachstum zeigte. Im Beginn wuchs er z. B. auf Pepton sehr langsam und schlecht; nach langer Kulturdauer „gewöhnte" er sich auch an diese Nährquelle. Zwar entwickelt er sich auch jetzt noch auf Pepton viel langsamer als auf Ammonoxalat, insbesondere werden darauf die Zellen viel kleiner als auf Oxalatlösungen, doch ist eine Anpassung an diesen Nährstoff durchaus nicht zu verkennen.

Zum Vergleich der Nitrat- und Ammonsalzwirkung dienten Nährlösungen von 0,25 % Natriumoxalat, welchen Kaliumnitrat resp. Ammonsulfat in Konzentrationen von 1—0,0001 % zugesetzt wurde. Dabei erwies sich das Ammonsalz dem Nitrat überlegen, was aber seinen Grund wohl weniger in der Art des Ions, als in der verschieden starken Alkaleszenz haben wird, da die Nitratkulturen bedeutend alkalischer wurden wie die Ammonkulturen. Dafür spricht auch der Umstand, daß mit steigender Konzentration der beiden Salze das Wachstum in den Nitratkulturen demjenigen auf Ammonsalz ganz bedeutend nachstand. Alle Versuchsreihen zeigten übereinstimmend, daß geringe Konzentrationen der erwähnten Stickstoffverbindungen eine schnellere Bakterienentwicklung hervorrufen; am schnellsten trat das Wachstum in Lösungen ein, die nur 0,005 % Ammonsulfat enthielten.

Es mag noch erwähnt werden, daß der Bazillus in Oxalatlösungen Nitrate nicht zu Nitriten zu reduzieren vermag.

VIII. Verbreitung des *Bacillus extorquens*.

Was nun das Vorkommen des *B. extorquens* anbetrifft, so habe ich ihn, wie erwähnt, zuerst in Exkrementen von Regenwürmern gefunden, die aus dem botanischen Garten von Basel stammten. Später habe ich ihn öfters von abgefallenem Laub und aus der den *Oxalis*- und *Rumex*-Wurzeln anhaftenden Erde aus demselben Garten isoliert, ferner aus abgefallenem Laub des „Lange-Erlen"-Parkes bei Basel und aus dem Boden eines Buchenwaldes bei Binningen (in der Nähe von Basel).

Weitere Untersuchungen über sein Vorkommen in der Natur habe ich nicht unternommen; immerhin ist zu erwarten, daß er in

Anbetracht seiner Befähigung, oxalsaure Salze zu verarbeiten, die ja fast überall in den Boden gelangen, wo Pflanzenwuchs vorhanden ist, eine weite Verbreitung hat. Allerdings wird dieser Nachweis durch die Schwierigkeit, ihn zu isolieren, sehr erschwert, ist doch seine Isolierung mittels der Plattenmethode so gut wie ausgeschlossen. Ein Beispiel möge das illustrieren: Ein mit Erde gefüllter Blumentopf wurde mit einer den Bazillus in Menge enthaltenden Oxalatlösung begossen. Jede folgende Woche erhielt der Topf frische sterilisierte Oxalatlösung, so daß die Topferde nie austrocknete; außerdem war sie durch Hineinbohren kleiner Kanäle genügend durchlüftet. Nach Ablauf von sechs Wochen wurden mit dieser Topferde als Impfmaterial Agar- und Gelatineplatten gegossen und außerdem Anreicherungskulturen mit Oxalatlösung angelegt. Die Erde wurde dann mit verdünnter Salzzäure digeriert; im Filtrat ließ sich aber kein Oxalat mehr nachweisen. Trotzdem bildete sich auf den Platten keine einzige Kolonie des *B. extorquens*, und erst die dritte Uberimpfung der Rohkultur auf Oxalatlösungen ergab die charakteristischen submersen rosafarbenen Häute dieses Bazillus.

Nun wird der beschriebene Bazillus unter den Bodenbakterien sicherlich nicht der einzige sein, der Oxalate zu zersetzen vermag, wie schon S. 266 und 275 angedeutet wurde. Während aber die beiden dort erwähnten Bakterien auf Oxalatlösungen sich nur äußerst kümmerlich entwickelten, dagegen sehr üppig auf den üblichen Zucker-Pepton-Nährböden, so werden diese wohl nur im äußersten Notfall die Oxalate als Nährquelle wählen, während der *B. extorquens* gerade auf Oxalaten sich ausgezeichnet vermehrt und deshalb auch ein interessantes physiologisches Untersuchungsobjekt darstellt.

In Anbetracht seiner Karbonatbildung aus organischen Säuren mag der Bazillus eine gewisse Rolle bei der „Entsäuerung“ des Bodens spielen, insbesondere in den an organischem Material reichen Böden, z. B. in Waldböden mit einer starken Streudecke.

IX. Schlußbetrachtung.

Im *Bacillus extorquens* haben wir einen Organismus kennen gelernt, der die im Pflanzenreich weitverbreitete Oxalsäure, selbst in ihren schwerlöslichen Salzen, zu verarbeiten vermag und sie somit wieder in den Kreislauf des Kohlenstoffes hineinzieht. Daß diese Fähigkeit im Haushalt der Natur von Bedeutung ist, erhellt

aus der großen Menge von oxalsaurem Kalk, die in den Boden hineingelangt. In Laubwäldern beträgt sie nach meinen Berechnungen mindestens 30 kg pro Jahr und ha.

Wenn nun die Veratmung der Oxalsäure durch *B. extorquens* einen einfachen Oxydationsvorgang darstellt, der durch ein Enzym besorgt wird, so stößt die Frage, wie dieser Bazillus aus Oxalsäure seine Leibessubstanz bildet, auf große Schwierigkeiten.

Etwaige Reduktionsprodukte der Oxalsäure, wie Ameisensäure einerseits, Glyoxyl- oder Glycolsäure andererseits konnten nicht nachgewiesen werden, dagegen vermochte sich dieser Organismus auf den genannten Stoffen, besonders aber auf Glyoxylsäure, recht gut zu entwickeln.

Es wäre aber auch möglich, daß der Bazillus die bei der enzymatischen Spaltung der Oxalsäure entstehende Kohlensäure reduzierte, z. B. zu Formaldehyd, auf dem er sehr gut wächst. Immerhin konnte auch dieser Körper in den Kulturen nicht nachgewiesen werden.

Beide in der Zelle des *B. extorquens* sich abspielenden Vorgänge, die Veratmung der Oxalsäure zu Kohlendioxyd wie ihre Verarbeitung zu Leibessubstanz, weisen auf die grünen Pflanzen hin, bei denen die Rolle der Oxalsäure trotz unzähliger Untersuchungen keineswegs aufgeklärt ist.

Bezüglich der Entstehung der Oxalsäure in den grünen Pflanzen stehen sich zwei Anschauungen gegenüber: die ältere von Palladin (1887), Schimper (1888) und Kohl (1889), nach welcher die Oxalsäurebildung mit der Synthese resp. dem Abbau der Eiweißstoffe zusammenhängt, und diejenige von Warburg (1886/8) und Wehmer (1891), wonach die Oxalsäure ein Atmungsprodukt ist, das bei der unvollständigen Oxydation der Zuckerarten u. dgl. gebildet wird.

Wehmer hat die Bedingungen der Entstehung und der weiteren Veratmung der Oxalsäure bei Pilzen studiert und fand dabei, daß da, wo die Oxalsäure nicht als schwerlösliches Calciumsalz abgelagert wird, sie bei höherer Temperatur weiter veratmet werden kann. Der biologische Sinn läge in dem Bestreben der Pilze, die Konkurrenz anderer Organismen auszuschalten.

Die Anschauungen Wehmers übertrugen dann Amar (1904) und Benecke (1903) auf die grünen Pflanzen, bei denen diese Forscher entweder durch Einschränkung der Ca-Darreichung oder durch die Wahl der Stickstoffquelle die Bildung von Calciumoxalat unterdrücken resp. einschränken konnten.

Es mag ja zutreffen, daß die Ablagerung von Calciumoxalat infolge von Calciummangel oder aus anderen Gründen beschränkt wird; maßgebend ist jedoch nicht die Produktion von oxalsaurem Kalk, sondern von Oxalaten resp. Oxalsäure überhaupt. Auch stehen den Wehmerschen Anschauungen betr. die Nichtzersetzbarkeit des Kalkoxalats innerhalb der Pflanze die Angaben von Aé, A. W. F. Schimper, Kohl, de Vries, Sorauer u. a. entgegen, wonach die Kalkoxalatkristalle gelöst werden, insbesondere bei Keimlingen und Zwiebeln.

Es leuchtet auch durchaus nicht ein, warum ein schwerlösliches nicht ebenso wie ein leichtlösliches Salz veratmet werden sollte, sofern man überhaupt zugibt, daß die Oxalsäure von den Pflanzen veratmet werden kann. Unter dieser Voraussetzung wird auch die Zersetzung von Calciumoxalat erfolgen, wenn auch, entsprechend dessen geringer Löslichkeit, bedeutend langsamer. Insofern erscheint also die Auffassung des Kalkoxalates als Reservestoff, die von G. Kraus (1897) vertreten wird, durchaus nicht so unhaltbar.

Die ganze Frage nach der Zersetzbarkeit resp. Nichtzersetzbarkeit des oxalsauren Kalkes in den grünen Pflanzen ist aber nach meiner Meinung von geringerer Bedeutung als die Frage nach der Entstehung der Oxalsäure. Daß die Oxalsäure das Produkt einer unvollständigen Oxydation repräsentiert, mag für Succulenten wohl zutreffen und dort durch ihr Auftreten die Schwierigkeit der Kohlendioxydaufnahme einigermaßen kompensieren. Wie steht es aber mit den nicht succulenten, jedoch viel Säure produzierenden *Rumex*-, *Oxalis*- und *Rheum*-Arten? Die teleologische Erklärung, die man bei den Succulenten hierfür gibt, läßt bei diesen Pflanzen vollständig im Stich, und ein plausibler Grund für die unvollständige Oxydation wegen Sauerstoffmangel läßt sich hier nicht ausfindig machen. Insofern wäre die schon von Liebig (1840) vertretene und neuerdings wieder von Baur (1908) aufgenommene Auffassung, wonach die Oxalsäure ein „erstes Assimilationsprodukt“ vorstellt, nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen. Besonders der Oxalsäurereichtum stark belichteter Blätter kann als Stütze dieser Hypothese dienen, umsomehr, als ja gerade in stark belichteten Pflanzenorganen die Oxalsäure bei ihrer Zersetzbarkeit durch das Licht besonders rasch zerfallen müßte! Jedenfalls könnte die Beobachtung Schimpers, ferner von Berthelot und André (1886) u. a., daß bei starker CO_2-Assimilation viel Oxalat entsteht, für die Auffassung der Oxalsäure als erstes Reduktionsprodukt der Kohlensäure in Anspruch genommen werden.

Sollte aber auch diese Auffassung noch zu wenig begründet sein, so scheint doch keine der vorher besprochenen Hypothesen genügend gestützt oder für alle Fälle zuzutreffen.

Mit dem Problem der Entstehung der Oxalsäure im Pflanzenkörper steht die Frage in Zusammenhang, ob grüne Pflanzen aus dieser Säure unter Umständen ihren gesamten Kohlenstoffbedarf zu decken vermögen. Ich habe darum mit Wasserpflanzen zahlreiche Versuche in dieser Richtung ausgeführt. Obwohl ich aus diesen orientierenden Versuchen, deren Methodik noch mit Mängeln behaftet war, keine entscheidenden Schlüsse zu ziehen wage, kann ich doch soviel sagen, daß die meisten Versuchspflanzen in schwachen Oxalatlösungen im Dunkeln gesunder aussahen, bedeutend länger am Leben blieben sowie in ihren Chloroplasten länger Stärke enthielten als die Kontrollpflanzen, denen ich kein Natriumoxalat gegeben hatte.

Obwohl ich die Auffassung der Oxalate als Produkte der CO_2-Assimilation zum mindesten für diskutabel halte, behaupte ich keineswegs, daß die Veratmung sowie die Verarbeitung der Oxalsäure zu Zellsubstanz bei den grünen Pflanzen unter allen Umständen auf gleiche Weise wie bei *B. extorquens* erfolgen muß. Denn auch dieser farblose Organismus veratmet nicht ausschließlich Oxalsäure und baut nicht nur aus ihr seine Leibessubstanz auf, sondern kann viele andere Kohlenstoffverbindungen als Nährstoffquellen verwenden. Das Protoplasma ist eben ein Körper, der die verschiedenartigsten Prozesse auslöst und sie regulatorisch zu lenken vermag.

Welche Rolle nun auch die Oxalsäure in den grünen Pflanzen spielt, jedenfalls wird uns die Beantwortung dieser Frage durch die Kenntnis eines Oxalsäure spaltenden Enzyms näher gerückt. Obwohl ein solches bisher erst im *B. extorquens* nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, daß es auch in den grünen Pflanzen vorkommt und auch dort die Spaltung der gebildeten Oxalsäure besorgt. Schon de Vries (1884, S. 341) hat den Einfluß höherer Temperatur auf die Entsäuerung von Pflanzenorganen nachgewiesen; auch das vom *B. extorquens* ausgeschiedene Enzym wirkt bei erhöhter Temperatur weit energischer. Auch die Befunde Wehmers, daß die vom Pilz gebildete Oxalsäure nur bei höherer Temperatur weiter veratmet wird, läßt sich durch die Annahme einer Enzymwirkung leichter verstehen als durch die Erklärung, daß der Pilz durch die höhere Temperatur derart begünstigt werde, daß er die Oxalsäure

als Kampfmittel entbehren könne und sie daher veratme. Die höhere Temperatur würde in gleichem Maße auch die Konkurrenten des Pilzes begünstigen.

Jedenfalls muß die Frage nach der Bildung der Oxalsäure in den höheren Pflanzen von neuem in Angriff genommen werden, da die bisher geäußerten sich widersprechenden Anschauungen weder eine für die meisten Fälle befriedigende Erklärung gebracht, noch den Verlauf und die Bedeutung der vermuteten Regulationen bei der Bildung und Zersetzung der Oxalsäure festgestellt haben.

Zusammenfassung der Resultate.

1. *Bacillus extorquens* ist ein meist 3 μ langes und 1,5 μ breites, mittels einer polaren Geißel bewegliches Stäbchen, das einen rosa- bis blutroten Farbstoff bildet und Gelatine nicht verflüssigt. Die Zellen sind plasmolysierbar und bilden keine Sporen. Bei Kultur in Nährlösungen mit Laubblättern oder Calciumoxalat zeigt der Bazillus oft Kalkinkrustation: eine „Bakteriosklerose". Er kommt in Wald- und Gartenerde vor.

2. Von 90 untersuchten Bakterien- und Pilzspezies vermag allein *B. extorquens* auf Oxalatlösungen gut zu gedeihen.

3. Er zersetzt nicht nur leicht-, sondern auch schwerlösliche Oxalate, wie Calcium-, Baryum- und Magnesiumoxalat. In einer 138 Tage alten Kultur wandelte er 94,47 % des zugesetzten Calciumoxalats in Karbonat um. Er brachte ferner Calciumoxalatkristalle in Blättern, Zwiebelschalen u. dgl. nach verhältnismäßig kurzer Zeit zum Verschwinden, während in unbeimpften sterilen Kontrollen noch nach 8 Monaten keine Abnahme des Calciumoxalatgehaltes zu konstatieren war; auch *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* und *Streptothrix odorifera* vermochten die Calciumoxalatkristalle in Laubblättern u. dgl. nicht zur Lösung zu bringen.

4. Eine durchlüftete Kultur des *B. extorquens* verarbeitete in 142 Tagen über 18 g Oxalsäure.

5. Weder im Destillat noch im Filtrat solcher Kulturen ließen sich irgendwelche Zwischenprodukte, wie organische Säuren, Alkohole und Aldehyde nachweisen. Als gasförmiges Zersetzungsprodukt tritt allein Kohlendioxyd auf.

6. Aus der Kohlenstoffbilanz ist zu ersehen, daß die gespaltenen Oxalsäuremengen die für die Lebensvorgänge nötige Energie liefern.

7. Der Sauerstoffkonsum bei der Oxalsäurezersetzung ergibt, daß diese in einem Oxydationsprozeß besteht, der nach der Gleichung $C_2O_4H_2 + O = 2\ CO_2 + H_2O$ verläuft.

8. Die Oxydation der Oxalate wird durch ein vom Bazillus abgeschiedenes Enzym bewirkt.

9. Die Atmungsintensität des *B. extorquens* ist sehr hoch, indem die Menge des ausgeschiedenen Kohlendioxyds pro 1 g Trockensubstanz in 24 Stunden 1,5—2,5 g beträgt.

10. Die optimale Oxalatkonzentration liegt für den *B. extorquens* zwischen 0,1 und 0,3 %; sie hängt im übrigen von seiner Empfindlichkeit gegen Alkali ab, die allerdings ziemlich hoch ist.

11. Außer auf Oxalsäure gedeiht der Bazillus noch sehr gut auf den niederen Gliedern der Oxalsäurereihe, ferner auf Mesoxal-, Glyoxal-, Glycol- und Ameisensäure, ferner auf Formaldehyd, Formamid und Oxamid, schließlich auf den niederen einwertigen Alkoholen, unter diesen am besten auf Methylalkohol, dann noch auf den mehrwertigen Alkoholen, wie besonders auf Glyzerin und Sorbit.

12. Eine Zersetzung des Calciumoxalats haben außer dem *B. extorquens* noch zwei andere Bodenbakterien bewirkt, wenn auch in viel schwächerem Grade als *B. extorquens;* die Annahme ist also berechtigt, daß oxalatspaltende Enzyme nicht auf den *B. extorquens* beschränkt sind.

Die obigen Untersuchungen wurden im Botanischen Institut der Universität Basel ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle meines hochverehrten und geliebten Lehrers, des leider zu früh verstorbenen Herrn Prof. Alfred Fischer in Dankbarkeit zu gedenken. Er hat meiner Arbeit stets das größte Interesse entgegengebracht und mich durch Bereitstellung reichlicher Hilfsmittel in der liberalsten Weise gefördert. Auch seinem Nachfolger, Herrn Prof. G. Senn, möchte ich für sein Wohlwollen und seine stete Hilfsbereitschaft herzlichst danken.

Literatur-Verzeichnis.

1904. Amar, M., Sur le rôle de l'oxalate de calcium dans la nutrition des végétaux. Annales des sciences naturelles, 8. sér., Botanique, t. 19, p. 195.

1869. Aé, H. A., Über die physiologische Bedeutung des in den Pflanzen vorkommenden oxalsauren Kalkes. Flora, S. 177.

1902. Bail, O., Untersuchungen einiger bei der Verwesung pflanzlicher Stoffe tätiger Sproßpilze. Centralbl. f. Bakt., II, Bd. 8, S. 567.

1912. Bassalik, K., Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien. Ztschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. 2, S. 1.

1904. Batelli, Oxydation de l'acide formique par les extraits de tissus animaux en présence de peroxyde d'hydrogène. Compt. rend., t. 138, p. 651.

1908. Baur, Emil, Über ein Modell der Kohlensäureassimilation. Zeitschr. f. physik. Chemie, 63, S. 683.

1870. Béchamp, A., Sur la fermentation carbonique et alcoolique de l'acétate de soude et de l'oxalate d'ammoniaque. Compt. rend., 1870, p. 69.

1896. Berg, A. et Gerber, C., Sur la recherche de quelques acides organiques dans les plantes. Bull. de la soc. chim. de Paris, II, t. 15, S. 1050.

1901. Beijerinck, M. W., Anhäufungsversuche mit *Ureum*-Bakterien. Centralbl. f. Bakt., II, Bd. 7, S. 33.

1903. Benecke, W., Über Oxalsäurebildung in grünen Pflanzen. Bot. Ztg., Bd. 61, S. 79.

1886. Berthelot et André, G., Sur la formation de l'acide oxalique dans la végétation; Étude du *Rumex acetosa*. Compt. rend., t. 102, S. 995.

1909. Bierema, St., Die Assimilation von Ammoniak, Nitrat, Nitrit und N durch Mikroorganismen. Diss. Leipzig.

1873. Blaß, A., Über die Schimmelbildung in den wässerigen Lösungen der organischen Säuren. Arch. d. Pharm., S. 306.

1905. Czapek, Biochemie der Pflanzen, I. Bd.

1903/5. Fresenius, R., Anleitung zur quantitativen chemischen Analyse. 2 Bände.

1889. Kohl, F. G., Kalksalze und Kieselsäure in den Pflanzen.

1905. Kohlrausch, F., Die Löslichkeit einiger schwerlöslicher Salze in Wasser bei 18°. Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. 50, S. 355.

1897. Kraus, Gr., Über das Verhalten des Kalkoxalats beim Wachstum der Organe. Flora, S. 54.

1908. Loehnis, B. und Pillai, N. K., Über N-fixierende Bakterien. Centralbl. f. Bakt., II, Bd. 21, S. 781.

1896. Maßen, A., Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Spaltpilze; die organischen Säuren usw. Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 12, S. 340.

1875. Mayer, Ad., Über die Bedeutung der organischen Säuren in den Pflanzen. Landw. Vers.-Stat., Bd. 18.

1882. Nägeli, C., Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen. Bot. Mitt, Bd. III, S. 395.

1910. Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen. 3. Aufl.

1887. Palladin, W., Bildung der organischen Säuren in den wachsenden Pflanzenteilen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 5, S. 325.

1894. Proskauer, B. und Beck M., Beiträge zur Ernährungsphysiologie des Tuberkelbazillus. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 18, S. 128.

1901. Richards, T. W., Caffrey, Mc Ch. F., Bisbee, H., Die Okklusion von Magnesiumoxalat durch Calciumoxalat und die Löslichkeit von Calciumoxalat. Zeitschr. f. anorg. Chemie, Bd. 28, S. 71.

1902. Salzmann, P., Chem.-physiol. Untersuch. über die Lebensbedingungen von zwei Arten denitr. Bakt. u. d *Streptothrix odorifera*. Diss. Königsberg.

1908. Sarafoff, Z., Oxydation de l'acide formique par les différentes tissus animaux en présence de H_2O_2. Thèse, Genève.

1888. Schimper, A. F. W., Über Kalkoxalatbildung in den Laubblättern. Bot. Ztg., Bd. 46, S. 65.

1890/2. Stohmann, F., Die Verbrennungswärme organischer Verbindungen. Zeitschr. f. Physik. Chemie, Bd. 6, S. 334 und Bd. 10, S. 410.

1904. Tafel, I., und Friedrichs, G., Elektrolytische Reduktion von Carbonsäuren usw. Ber. d. chem. Ges., 37 (3), S. 3187.

1911. Tangl, Fr. und Weiser, St., Untersuch. über die Veränderungen des Nährwertes des Futters beim Einsäuern usw. Landw. Vers.-Stat., Bd. 74, S. 263.

1891. Tataroff, D., Die Dorpater Wasserbakterien. Diss. Dorpat.

1911. Tobler, F., Zur Ernährungsphysiologie der Flechten. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 29, S. 3.

1905. Treboux, O., Organische Säuren als C-Quellen bei Algen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 23, S. 432.

1895. Vitali, D., Zitiert nach Chem. Centr., Bd. I. Referat aus L'Orosi, Bd. 18, S. 304.

1884. Vries, de, H., Über die periodische Säurebildung der Fettpflanzen. Bot. Ztg., Bd. 42, S. 337.

1886/8. Warburg, O., Über die Bedeutung der organischen Säuren für den Lebensprozeß der Pflanzen. Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen, Bd. 2, S. 53.

1891. Wehmer, C., Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Ztg., Bd. 49, S. 233.

1881/5. Wilson, W. P. (Pfeffer, W.), Über intramolekulare Atmung. Unters. a. d. bot. Institut Tübingen, Bd. I, S. 636.

1900. Wortmann, J., Untersuchungen über das Bitterwerden der Rotweine. Landw. Jahrb., B. 29, S. 629.

Curriculum vitae.

Ich, Kasimir Maryan Anton Bassalik bin als Sohn der verstorbenen Julian Bassalik, Lehrer und der Wanda geb. von Piotrowicz am 12. Juni 1879 in Brzezie (Posen) geboren. Nachdem ich zu Hause privatim für das Gymnasium vorbereitet wurde, kam ich an das Marien-Gymnasium nach Posen, welches ich von 1891—1897 besuchte und wo ich die Befähigung zum einjährig-freiwilligen Dienst erlangte. Hierauf begab ich mich in die forstliche Praxis und von da auf die Königl. Sächs. Forstakademie in Tharandt, die ich von 1899—1902 besuchte. Hierauf arbeitete ich als Forstingenieur in Russisch-Polen, bis ich im Wintersemester 1904 mich in der philosophischen Fakultät der Universität Berlin immatrikulieren ließ, wo ich Naturwissenschaften studierte. Zu demselben Zweck bezog ich im Wintersemester 1906 die Universität Basel. Im Jahre 1910 machte ich in Kalisch das Maturitätsexamen.

Meine hauptsächlichsten Lehrer, denen ich auch an dieser Stelle meinen herzlichen Dank sage, waren in Tharandt die Herren: PProf. Neumeister, Nobbe, Nitsche, Wislicenus, Weinmeister, Vater, Kunze u. a.; in Berlin: Schwendener, F. E. Schulze, A. Engler, P. Drude, Claisen, E. Baur, W. Busse, L. Diels, W. Ruhland, O. Jaekel, A. Brauer u. a.; in Basel: Alfr. Fischer, G. Senn, Fr. Fichter, Aug. Hagenbach und G. von Bunge.